

Charakterisierung eines Cisplatin-DNA-spezifischen Antikörpers und seiner Komplexe mittels massenspektrometrischer Methoden

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Lena Ruhe

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Michael W. Linscheid

2. PD Dr. Jürgen Thomale

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2017

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Nutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Berlin, den 25.01.2017

Lena Ruhe

Kurzfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Analytik eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch auf Cisplatin-behandelte DNA reagiert und bereits routinemäßig zu diagnostischen Zwecken bei der Krebstherapie mit ebendiesem Zytostatikum eingesetzt wird. Zu diesem Zweck wurden vor allem massenspektrometrische Methoden eingesetzt, um einerseits den genauen Aufbau sowie die Zusammensetzung des Antikörpers zu untersuchen und andererseits die Antigenspezifität einer genaueren Betrachtung zu unterziehen. Mit Hilfe von nano-ESI-MS konnte der Antikörper unter Erhalt der nativen Struktur in der Gasphase analysiert werden. Tandem-MS-Experimente lieferten nicht nur einen Einblick in typische Fragmentierungsmuster, sondern generierten z. T. auch Informationen über die Primärsequenz einiger Bereiche des Antikörpers. Die im Fc-Teil gebundenen Glycanstrukturen, die sowohl für die Struktur als auch die Funktionalität des Antikörpers eine entscheidende Rolle spielen, wurden nach enzymatischer Abspaltung separat mit Hilfe von MALDI-MS analysiert. Die vollständige Antikörpersequenz wurde durch proteolytische Spaltung des Antikörpers, Analytik mittels hochaufgelöster Tandem-MS und anschließendem Vergleich mit Daten aus der Sequenzierung auf DNA-Ebene bzw. bekannten Antikörpersequenzen aus Proteindatenbanken aufgeklärt. Im selben Zug konnten auf Peptidebene eine Vielzahl verschiedener posttranslationaler Modifikationen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Antikörper unter Erhalt seiner Struktur und der antigenbindenden Eigenschaften an den Zuckerstrukturen mit einem eigens synthetisierten Metallkomplex markiert werden kann.

Die für die Spezifitätsstudie des Antikörpers notwendigen Antigene wurden durch Inkubation synthetischer einzel- und doppelsträngiger DNA-Oligomere mit Cisplatin erzeugt und analysiert. Anschließend wurden die verschiedenen Antikörper-Antigen-Komplexe unter nativen Bedingungen hergestellt und massenspektrometrisch charakterisiert. Um einen Eindruck von der Komplexstabilität zu erhalten wurden zusätzlich MS/MS-Untersuchungen des Komplexes mit der platiniierten doppelsträngigen DNA durchgeführt. Wie bei der Analytik des freien Antikörpers konnten auch hier spezifische Fragmente detektiert werden.

Abstract

The focus of the thesis was the characterization of a monoclonal antibody, which binds specifically to cisplatin-treated DNA and is already used for diagnostic purposes in cancer therapy. The structure and composition of the antibody, as well, as the antigen specificity were investigated by mass spectrometry. Using nano-ESI-MS it was possible to analyse the antibody in its native state. Tandem-MS experiments revealed not only specific antibody fragments but also gave information on the primary structure of the antibody. The Fc-bound glycans that are responsible for antibody structure and functionality, were cleaved enzymatically and studied with MALDI-MS. For a detailed determination of the primary structure, the antibody was proteolysed with different enzymes and analyzed via high resolution Tandem-MS. The data was evaluated by comparison with results from sequence analysis on DNA level and known antibody sequences from protein databases. Simultaneously many different posttranslational modifications were identified. Furthermore, the antibody was successfully labelled with a metal complex at its sugar structures without loss of its structure and function.

For investigation of the antibody specificity antigens were generated by incubation of well-defined single and double stranded DNA oligomers with cisplatin. Antibody-antigen-complexes were synthesized and analyzed by mass spectrometry under native conditions. The stability of the complex with double stranded DNA was also investigated by MS/MS-experiments. Thus, it was also possible to determine the specific fragmentation behavior for the complex just as for the free antibody.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	Acrylamid
AG	Antigen
AK	Antikörper
ACN	Acetonitril
ADC	<i>Antibody-drug conjugate</i> , (Antikörper-Wirkstoff-Konjugat)
ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i> , (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
BA	Bisacrylamid
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , (Rinderserumalbumin)
CDR	<i>Complementary determining region</i>
CE	<i>Capillary electrophoresis</i> , Kapillarelektrophorese
CID	<i>Collision induced dissociation</i> , (Stoßinduzierte Dissoziation)
C _H	<i>Constant heavy chain</i> , (konstanter Teil der schweren Kette)
C _L	<i>Constant light chain</i> , (konstanter Teil der leichten Kette)
C	Cytosin
CRM	<i>Charge Residue Model</i>
CT	Chymotrypsin
cPAK	Cisplatin-DNA-spezifischer Antikörper
DIBO	Dibenzocyclooctin
DNA	<i>Desoxyribonucleid acid</i> , (Desoxyribonukleinsäure)
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
ECD	<i>Electron capture dissociation</i> , (Elektroneneinfangdissoziation)
ETD	<i>Electron transfer dissociation</i> , (Elektronentransferdissoziation)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FA	<i>formic acid</i> , (Ameisensäure)
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> , (Antigen-bindendes Fragment)
Fc	<i>Fragment crystallizable</i> , (kristallisierbares Fragment)
FWHM	<i>Full width at half maximum</i> , (Halbwertsbreite)
FR	<i>Fragment region</i> , (Gerüstregion)
FT-ICR	<i>Fourier tranform ion cyclotron resonance</i> , (Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz)
G	Guanin
HC	<i>Heavy chain</i> (Schwere Kette)
HCD	<i>Higher energy collisional induced dissociation</i> , (Hochenergie-Stoßaktivierung)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , (Hochleistungsflüssigchromatographie)

IAC	Immunoaffinitätschromatographie
ICA	<i>Immune-cytological assay</i> , (Immunzytologischer Assay)
ICL	Interstrang- <i>Crosslink</i> (Interstrang-Quervernetzung)
ICP	<i>Inductively coupled plasma</i> , (Induktiv gekoppeltes Plasma)
IEM	<i>Ion Evaporation Model</i>
Ig	Immunglobulin
IRMPD	Infrarot-Multiphotonendissoziation
IT	<i>Ion trap</i> , (Ionenfalle)
KE	Kollisionsenergie
KT	Kalbsthymus
LA	Laserablation
LC	<i>Light chain</i> , (Leichte Kette)
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> , (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/ Ionisation)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>Molecular weight</i> , (Molekulargewicht)
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
pI	Isoelektrischer Punkt
PFF	Peptidfragmentfingerprint
PMF	Peptidmassenfingerprint
PTM	Posttranslationale Modifikation
Q/q	Quadrupol
RP	<i>Reversed phase</i> , (Umkehrphase)
r.t.	<i>Chromatographic retention time</i> , (Chromatographische Retentionszeit)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate, (Natriumdodecylsulfat)
T	Thymin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TL	Thermolysin
ToF	<i>Time of flight</i> , (Flugzeit)
Tr	Trypsin
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V _H	<i>Variable heavy chain</i> , (variabler Teil der schweren Kette)
V _L	<i>Variable light chain</i> , (variabler Teil der leichten Kette)

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	i
Abstract	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
Inhaltsverzeichnis	v
1. Motivation und Zielsetzung	1
2. Einleitung	3
2.1 DNA-Schädigungen – Krebstherapie mittels Cisplatin	3
2.2 Antikörper – entscheidende Faktoren der Immunantwort	7
2.2.1 Klassifizierung von Antikörpern	9
2.2.2 Monoklonale Antikörper	12
2.2.3 Posttranslationale Modifikationen	13
2.2.4 Cisplatin-DNA-spezifischer Ratten-Antikörper (cPAK)	17
2.3 Massenspektrometrie	20
2.3.1 Ionisationsmethoden	20
2.3.2 Massenanalysatoren	23
2.3.3 Native Massenspektrometrie	26
2.4 Verwendung und Charakterisierung von Antikörpern	28
2.4.1 Markierung von Antikörpern	31
2.4.2 Sequenzbestimmung von Antikörpern	33
3. Ergebnisse und Diskussion	37
3.1 Charakterisierung des Antikörpers	37
3.1.1 Analytik des Antikörpers mittels nativer MS und MS/MS	40
3.1.2 Analytik der N-Glycosylierungsstelle	61
3.1.3 Sequenzierung des Antikörpers auf Proteinebene	68
3.2 Markierung des Antikörpers an den Zuckerstrukturen	81
3.3 Wahl und Charakterisierung der Antigene des cPAK	91
3.4 Antigen-Antikörper-Komplexe	97

4. Zusammenfassung und Ausblick	105
5. Experimenteller Teil	109
5.1 Chemikalien und Puffer	109
5.2 Geräte und sonstiges.....	112
5.3 Methoden.....	113
5.3.1 Vorbereitung des Cisplatin-Antikörpers	113
5.3.2 Deglycosylierung des Antikörpers	114
5.3.3 Herstellung des Markierungsreagenzes DIBO-DOTA(Tb)	116
5.3.4 Markierung des Antikörpers.....	117
5.3.5 Herstellung der Antigen-Antikörper-Komplexe	118
5.3.6 Gelelektrophorese.....	119
5.3.7 Nichtkompetitiver ELISA.....	121
5.3.8 Native nano-ESI High-Mass Q-ToF-MS und -MS/MS.....	122
5.3.9 MALDI LTQ Orbitrap-MS und –MS/MS.....	124
5.3.10 Sequenzierung des Antikörpers	124
5.3.11 Analyse des proteolysierten cPAK mittels hochauflösender nano-HPLC ESI-MS/MS.....	125
5.3.12 Analyse der DNA mittels HPLC-UV-ESI-MS.....	126
5.4 Auswertung der proteolytischen MS und MS/MS-Daten des cPAK.....	127
5.4.1 Automatisierte Auswertung mittels PEAKS.....	127
5.4.2 Manuelle Auswertung der (de)glycosylierten Peptide.....	128
6. Literatur	129
7. Anhang.....	144
7.1 Ergänzende Spektren und Abbildungen	144
7.2 Ergänzendes zur Antikörper-Sequenzierung.....	151

1. Motivation und Zielsetzung

Beginnend mit ihrer erstmaligen Entdeckung vor über 100 Jahren sind Antikörper (AK) inzwischen unersetzliche Instrumente in naturwissenschaftlicher Forschung und Praxis geworden. In der Anfangszeit wurden hauptsächlich Aufbau und Funktionalität erforscht, während sie heutzutage eine selbstverständliche Anwendung in jedwedem Bereich finden. So werden Antikörper, vor allem auch kommerziell vertriebene, weltweit standardmäßig beispielsweise als Sonde zur Erkennung von Proteinverteilungen in Geweben oder als Markierungsreagenz in der Krebsforschung eingesetzt. Diese Entwicklung hat allerdings nicht nur positive Seiten, so formulierte M. BAKER jüngst die Aussage „Antikörper wären zwar die Arbeitspferde biologischer Experimente, übersäten das Feld jedoch mit falschen Befunden“.^[1] Im Rahmen der Qualitätssicherung, um eine falsche Anwendung vermeintlich spezifischer Antikörper zu vermeiden sowie die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit antikörperbasierter Methoden sicherzustellen, ist eine genaue Charakterisierung unumgänglich.

Der Antikörper, der in dieser Arbeit untersucht werden soll, wurde speziell zur Erkennung von DNA-Cisplatin-Addukten im Rahmen der Krebstherapie entwickelt und wird bisher ausschließlich zu diagnostischen Zwecken in der Forschung eingesetzt.^[2] Ziel ist dabei den Wirkungsmechanismus des Zytostatikums verfolgen zu können, indem bspw. Cisplatin-behandelte DNA mit Hilfe des Antikörpers extrahiert und analysiert oder DNA-Schädigungen direkt in Zellen lokalisiert und visualisiert werden. Im besten Fall lässt sich so die Entstehung von Nebenwirkungen und Resistenzen besser verstehen und die Therapie aufbauend auf diesen Erkenntnissen effektiv verbessern. Zu diesem Zweck soll der Antikörper in jeder erdenklichen Hinsicht analytisch genauestens charakterisiert werden. Dazu zählt zunächst die exakte Bestimmung der molekularen Masse des Antikörpers, im nativen und denaturierten Zustand, die Kenntnis über die Aminosäuresequenz und im Besonderen auch der verschiedenen posttranslationalen Modifikationen. Um diese Ziele zu erreichen sollen neben Gelelektrophorese und ELISA vor allem verschiedene massenspektrometrische Verfahren angewendet werden. So eignet sich die Ionisation mittels nano-ESI aus einem wässrigen Puffersystem ausgezeichnet, große Biomoleküle wie Antikörper ohne Zerstörung der nativen Struktur zu untersuchen. Auf dieser Basis kann die sogenannte *Top-down*-Methode zur Sequenzbestimmung des Antikörpers angewendet werden, indem das Molekül in der Gasphase fragmentiert und analysiert wird. Im *Bottom-up*-Verfahren wird der Antikörper hingegen zunächst enzymatisch in kleinere Peptide gespalten und diese dann mittels einer geeigneten HPLC-MS/MS-Methode analysiert. Auf Peptidebene lassen sich Oxidation von Aminosäuren, unterschiedliche Zuckerstrukturen oder sonstige natürliche und unnatürliche Modifikationen durch geringfügige Änderungen in der

1. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Masse nachweisen. Sowohl äußere Einflüsse wie pH-Wert-Änderungen als auch bspw. lagerungsbedingte Degradation können zu einem Verlust an Bindungsaktivität führen. Auch der Einsatz von Reduktionsmitteln führt mitunter zur vollständigen Zerstörung der Antikörperstruktur, was massenspektrometrisch gut nachvollzogen werden kann. Mit Hilfe von Tandem-MS-Experimenten unter nativen Bedingungen können anhand charakteristischer Fragmentbildungen Rückschlüsse auf besonders labile Bindungen und damit bevorzugte Bruchstellen im Antikörper gezogen werden.

Die unbestreitbar wichtigste Eigenschaft des Antikörpers besteht in der spezifischen Wechselwirkung des Paratops mit dem Epitop des Antigens (AG), was in der Ausbildung eines nicht-kovalenten Komplexes resultiert. Die notwendigen Antigene sollen selbstständig durch Platinierung synthetischer DNA-Oligomere hergestellt und anschließend charakterisiert werden. Die native Massenspektrometrie bietet hier ebenfalls exzellente Voraussetzungen, da nicht nur Antigen und Antikörper sondern auch der Komplex bei Auswahl geeigneter Bedingungen von Ionisation und Transfer durch das Massenspektrometer unversehrt bleiben sollten. Kann der Komplex auf diese Weise erfolgreich untersucht werden, bietet sich durch MS/MS-Experimente die Möglichkeit, die Stabilität ebendieses durch Energiezufuhr zu evaluieren.

Ein weiteres Ziel der Arbeit besteht in der Entwicklung einer alternativen Methode zur Metallmarkierung des Antikörpers, die unter milden Bedingungen abläuft und möglichst keine Einschränkung bzw. den Verlust antigenbindender Aktivität nach sich zieht. Zunächst soll dafür an den Zuckerstrukturen enzymatisch eine nicht-natürliche Azidfunktionalität eingeführt werden, an welche im nächsten Schritt mittels 1,3-dipolarer Cycloaddition (*Huisgen*-Reaktion) ein Lanthanoidkomplex auf Basis eines DOTA-Rings geknüpft wird. Zu diesem Zweck soll ein Reagenz synthetisiert werden, das eine gespannte Alkinbindung trägt, um Einsatz von Kupfer als Katalysator der Cycloadditionsreaktion zu vermeiden. Insgesamt soll so eine Markierungsmethode gefunden werden, die sich nicht nur durch hohe Biokompatibilität auszeichnet, sondern auch sehr spezifisch und ohne Nebenreaktionen abläuft. Durch die Sequenzierung des Antikörpers sollte zum einen ein geeignetes Enzym und zum anderen eine passende HPLC-MS-Methode gefunden werden, um jeden einzelnen Markierungsschritt anhand des Glycopeptids verfolgen zu können.

2. Einleitung

2.1 DNA-Schädigungen – Krebstherapie mittels Cisplatin

Bei Krebs handelt es sich definitionsgemäß um das unkontrollierte Wachstum (Proliferation) von Zellen, das zur Ausbildung maligner Tumore führt. Laut der *WORLD HEALTH ORGANIZATION* (WHO) zeichnen sich Krebserkrankungen, nach Herz-Kreislauf-Krankheiten, für den größten Teil der Todesfälle in den westlichen Industrienationen verantwortlich.^[3-4] Zusätzlich dazu wird weltweit mit einer Steigerung der Diagnosen um bis zu 70 % über die nächsten zwei Jahrzehnte gerechnet, vor allem in den Entwicklungsländern. Dementsprechend besteht nach wie vor großes Forschungsinteresse auf diesem Themengebiet um einerseits die Erkrankung und die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen und andererseits neue und verbesserte Therapieformen bzw. Medikamente zu entwickeln.^[5] Klassischerweise werden Tumore, sofern möglich, durch chirurgische Eingriffe entfernt, mittels Strahlentherapie behandelt und/oder zusätzlich Chemotherapeutika eingesetzt.^[6] Letztere greifen direkt in den Zellzyklus ein und stören bzw. unterdrücken unter anderem die Prozesse, die für Zellteilung verantwortlich sind. Die Zytotoxizität beschränkt sich allerdings nicht nur auf Tumorzellen, die aufgrund ihrer erhöhten Proliferationsrate und oftmals eingeschränkter Reparaturkapazität, besonders sensibel auf die Behandlung reagieren.^[7-8] Auch gesunde Zellen werden entsprechend angegriffen, was zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen während der medikamentösen Therapie führt. Eines der bekanntesten Zytostatika ist *cis*-Diammindichloroplatin(II), bekannt auch als Cisplatin, dessen wachstumshemmende Wirkung von B. ROSENBERG entdeckt und das bereits seit den 70er Jahren erfolgreich in der klinischen Onkologie eingesetzt wird.^[9-10] Bis heute kommt es vor allem zur Behandlung von Hoden- und Ovarialkarzinomen, Keimzelltumoren, Lymphomen, sowie Blasen-, Lungen- und Hautkrebs zum Einsatz.^[11] Wissenschaftler sind sich weitestgehend einig darüber, dass die Zytotoxizität auf der Bindung des Platinkomplexes an die DNA des Zellkerns beruht. Auf diese Weise wird die DNA-Replikation und Transkription inhibiert, was üblicherweise eine Signalkaskade zur Initiierung des Zelltods (Apoptose) in Gang setzt.^[12] Um einerseits die Nebenwirkungen zu reduzieren und andererseits die Anti-Tumor-Aktivität zu erhöhen, erfolgt die Gabe von Cisplatin häufig in Kombination mit anderen zytotoxischen Medikamenten wie Melphalan und Chlorambucil (sog. Alkylantien), Antimetaboliten oder Topoisomerase II-Inhibitoren, die die DNA-Replikation zusätzlich hemmen.^[13-15] Antiemetika hingegen unterdrücken die auftretende starke Übelkeit, was eine ausgedehnte Chemotherapie überhaupt erst ermöglicht.^[16] Nach wie vor stellen vor allem die starke Nephro- und Ototoxizität sowie neurotoxische Schädigungen ein großes Problem dar.^[17]

2. EINLEITUNG

Zudem konnte beobachtet werden, dass einige Tumore scheinbar resistent sind bzw. einige nach gewisser Zeit eine deutlich erhöhte Toleranz gegen die Gabe von Cisplatin aufweisen.^[18-19] Um diesen Herausforderungen zu begegnen wurden neue Cisplatin-Analoga, wie die weltweit zur Krebstherapie zugelassenen Medikamente Oxaliplatin und Carboplatin entwickelt (Abb. 2.1).^[20]

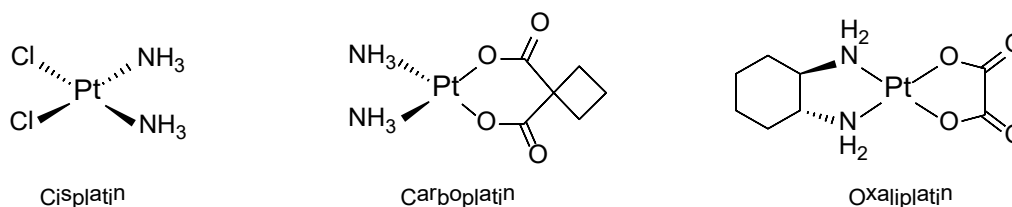


Abbildung 2.1: Strukturformeln der weltweit zugelassenen Zytostatika Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.

Die zytostatische Wirkung beruht auf demselben Prinzip, wenngleich beide Spezies weniger reaktiv sind, was sich wiederum in erheblich reduzierter Nephro- und/oder Ototoxizität bemerkbar macht.^[21] Mit dem Einsatz der Analoga konnte auch das Wirkungsspektrum erweitert werden. So wird Carboplatin bspw. erfolgreich in der Therapie gegen Ovarialkarzinome und Oxaliplatin gegen Darmkrebs verwendet.^[22] Ähnlich wie bei Cisplatin kann jedoch auch hier über die Behandlungszyklen oft eine zunehmende Resistenz der Tumore beobachtet werden. Diese Tatsache wird mit einer erhöhten Toleranz der Zelle gegenüber DNA-Schäden, einer erhöhten Reparaturaktivität sowie vermehrter Ausschleusung des Zytostatikums aus der Zelle assoziiert.^[23]

Wirkungsmechanismus und Reaktionen von Cisplatin

Die Gabe von Cisplatin kann entweder intravenös oder intraperitoneal erfolgen.^[24] Im Blutplasma zirkuliert das Cisplatin in seiner inaktiven Form als quadratisch-planarer Komplex mit je zwei Amin- und zwei Chloroliganden. Bereits hier wird der größte Teil des Cisplatins durch Serumproteine gebunden und vom Organismus wieder ausgeschieden.^[25-26] Zum eigentlich Wirkungsort in die Zellen gelangt das Cisplatin entweder durch passive Diffusion oder über aktiven Transport bspw. durch den Kupfertransporter CTR1 in der Zellmembran.^[27] Aufgrund der, verglichen mit dem Blut, ca. zehnfach geringeren Chloridkonzentration im Cytosol erfolgt hier die Hydrolyse, also der Austausch der Chlorid- gegen Aqualiganden. Besonders die einfach positiv geladene Monoaqua Spezies $cis-[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$ gilt als starkes Elektrophil. Neben der Bindung an die nukleare DNA existiert eine Vielzahl anderer potentieller Abfangreaktionen in der Zelle. So zeigt die reaktive Platinspezies eine sehr hohe

2. EINLEITUNG

Affinität zu schwefelhaltigen Proteinen und Peptiden. Vor allem die Bindung zu Glutathion und Metallothioneinen wird vielfach beobachtet und deren Einfluss auf zu- oder abnehmende Resistenz der Zellen gegen Cisplatin nach wie vor untersucht.^[28-29]

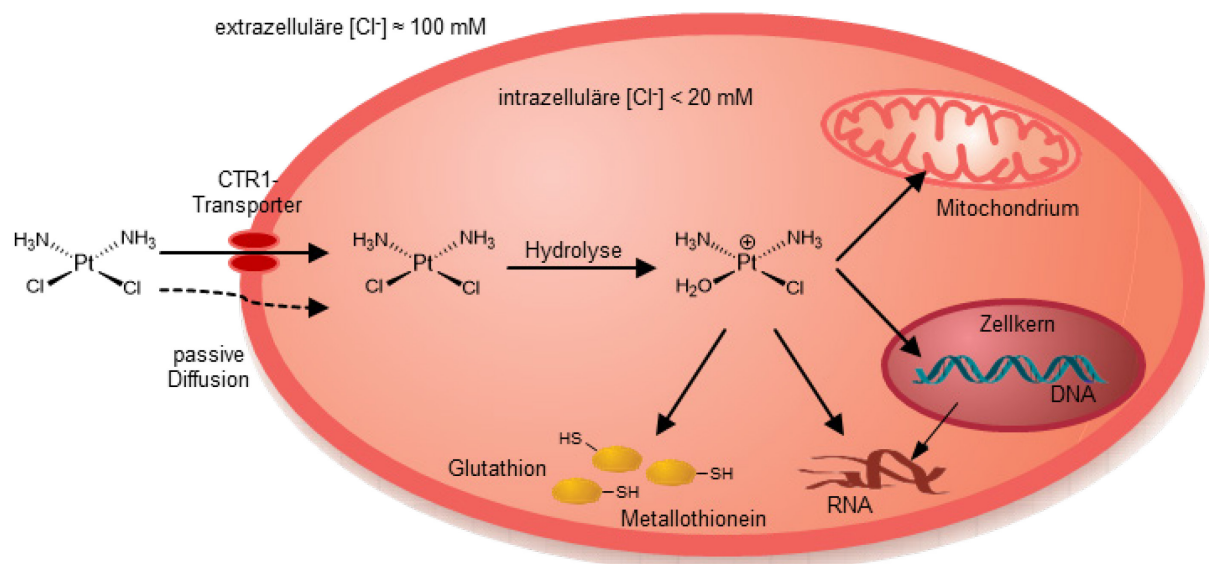


Abbildung 2.2: Zelluläre Aufnahme des Cisplatins über aktive und passive Transportmechanismen sowie Reaktionen der aktiven Monoaquaspezies mit verschiedenen Zellbestandteilen (modifiziert nach VOIGT *et al.*).^[30]

Im Zellkern reagiert das Cisplatin zunächst mit den nukleophilen N7-Positionen der Purinbasen, wobei Guanin (G) gegenüber Adenin (A) bei der Ausbildung des monofunktionalen Addukts stark bevorzugt wird.^[31] Liegt DNA als Einzelstrang vor (*single stranded-DNA*, ss-DNA) können aufgrund der besseren Zugänglichkeit auch die N1-Position des Adenins (A) und die N3-Position des Cytosins (C) attackiert werden (**Abb. 2.3 a**).^[32] Nach der Hydrolyse des zweiten Chloridliganden können im nächsten Schritt Quervernetzungen (*Crosslinks*) durch kovalente Bindung an nahe Nukleobasen gebildet werden. Man unterscheidet hierbei zwischen Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Strangs, sog. Intrastrang-*Crosslinks*, und solchen, bei denen sich die andere Base auf dem komplementären DNA-Strang befindet (Interstrang-*Crosslinks*, ICLs).^[33-34] Die Veröffentlichungen der letzten Jahre auf dem Forschungsgebiet geben an, dass zu über 90 % die kinetisch begünstigten Intrastrang-Addukte und unter diesen vor allem das 1,2-Pt(GG)-Addukt gebildet werden. Mit geringerer Häufigkeit werden auch 1,3-Verbrückungen ausgebildet. Die Verknüpfung zweier Nukleotide mittels Cisplatin zieht immer eine Veränderung der dreidimensionalen DNA-Struktur nach sich. Mittels Röntgenstrukturanalytik und Kernspinresonanzuntersuchungen (*nuclear magnetic resonance*, NMR) in Lösung konnte gezeigt werden, dass sich die globale DNA-Struktur durch 1,2-Intrastrang-Addukte um bis zu 60° verzerrt (**Abb. 2.3 b**).^[35-36] Laut landläufiger Meinung

2. EINLEITUNG

werden Interstrang-*Crosslinks* nur in geringem Maße gebildet, haben aber einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität.^[37] In **Abb. 2.3 c** ist gut zu erkennen, dass die DNA-Helix nicht nur verzerrt wird sondern es auch zu einer Aufwindung des Doppelstranges kommt. Die dem Guanosin gegenüberliegende Cytidin-Einheit wird aus der Helix herausgedreht.

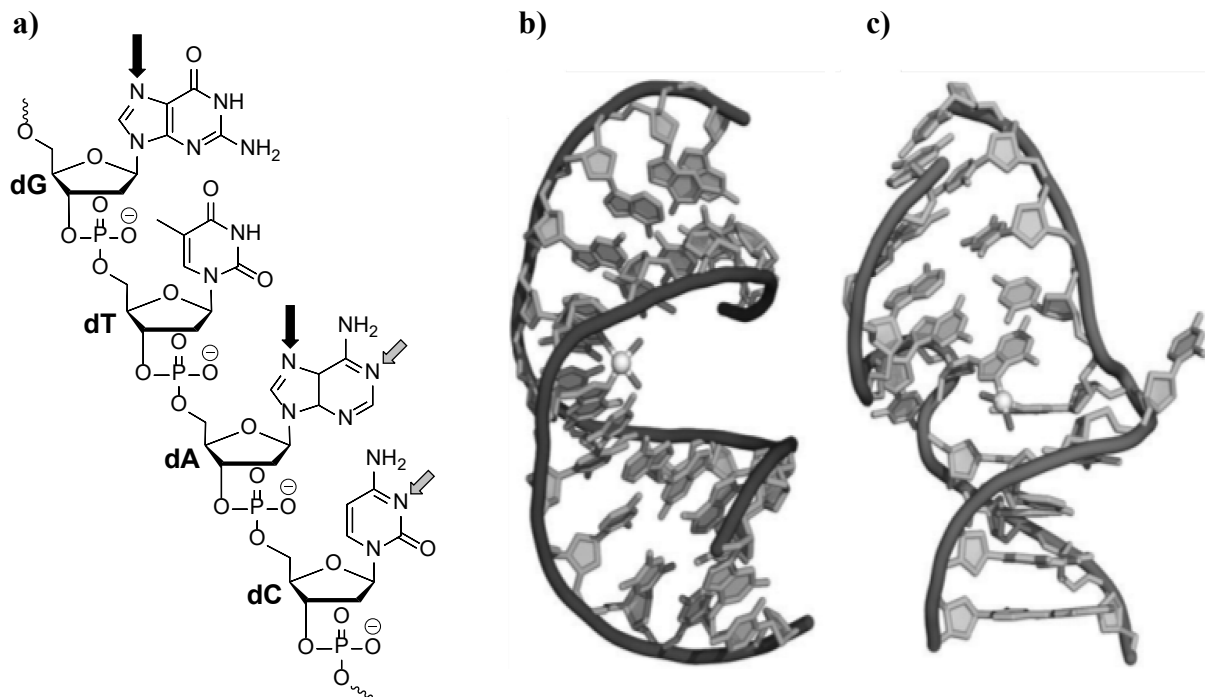


Abbildung 2.3: a) Bevorzugte Angriffsstellen für Cisplatin an Guanin (G), Thymin (T), Adenin (A) und Cytosin (C), b) NMR-Struktur eines Intrastrang-cis-[Pt(NH₃)₂(GG)]-Addukts in Lösung und c) eines Interstrang-cis-[Pt(NH₃)₂(GG)]-Addukts in Lösung eines ds-DNA-Dodecamers nach TODD *et al.* ^[37-38]

Im Gegensatz zu Intrastrangverknüpfungen können diese Addukte nicht durch die einfache Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) beseitigt werden, da hier beide Stränge involviert sind. Stattdessen wurde ein sequentieller Mechanismus vorgeschlagen. Zunächst werden die Nukleotide um die Läsion des einen Strangs entfernt und mittels Polymerase und Ligase wieder aufgefüllt. Anschließend erfolgt dieselbe Prozedur am komplementären Strang.^[39] Im Rahmen seiner Dissertation fand M. ZIEHE viele Hinweise darauf, dass exakt dieser Mechanismus bei der Reparatur der Interstrang-Läsionen eine wichtige Rolle spielt.^[40] Die zu diesem Zweck entwickelte schonende Analyseverfahren zur Untersuchung der Bildung und Dynamik von Cisplatin-Addukten anhand eines Mausmodells legt außerdem die Vermutung nahe, dass *in vivo* wesentlich mehr Interstrang-Verknüpfungen gebildet werden als allgemein angenommen. Vielfach erfolgt demnach zwar zuerst die Bildung der kinetisch bevorzugten 1,2-Addukte, im Laufe der Zeit (> 12 h) erfolgt allerdings eine Umlagerung zu ICLs.^[41]

2.2 Antikörper – entscheidende Faktoren der Immunantwort

Alle lebenden Organismen sehen sich in ihrem Überleben stets äußeren Einflüssen wie beispielsweise Angriffen durch Viren, Bakterien oder andere natürliche sowie synthetische toxische Substanzen ausgesetzt, die ihren Fortbestand gefährden. Aus diesem Grund hat sich evolutionär das Immunsystem entwickelt, das grundsätzlich auf zwei verschiedenen Prinzipien beruhen kann. Zum einen der unspezifischen (angeborenen) Immunantwort sowie der nur bei Wirbeltieren existenten deutlich komplexeren spezifischen (adaptiven) Immunantwort.^[42-43] Neben den ersten physiologischen Barrieren wie der Haut, Schleimhäuten oder auch den stark sauren Bedingungen im Magen, beruht ein großer Teil der angeborenen Immunreaktion auf der Erkennung typischer körperfremder Strukturen eingedrungener Pathogene durch Mikro- und Makrophagen.^[44-46]

Die adaptive Immunantwort wird durch antigenpräsentierende Zellen initiiert, wobei der sogenannte humorale Teil der Antwort durch T-Lymphozyten ausgelöst wird.^[47-48] Über zellmembrangebundene Rezeptoren, die T-Zell-Rezeptoren, werden Peptide als Antigen präsentiert und erkannt und, sofern als pathogen eingestuft, Maßnahmen zur Vernichtung entsprechender Zellen eingeleitet.^[49] Über diesen Mechanismus erfolgt die Reifung zu sogenannten zytotoxischen T-Zellen, die spezifisch auf nur ein einziges Antigen reagieren und vor allem gegen virusinfizierte und maligne entartete Zellen aktiv sind.^[50-51] Ebenfalls zur Untergruppe der T-Lymphozyten gehören die T-Helferzellen. Diese sind von enormer Bedeutung, sowohl für die zelluläre Immunantwort – indem sie die zytotoxischen T-Zellen unterstützen – als auch für die humorale, da sie die Aktivierung und Proliferation von B-Lymphozyten stimulieren, die letztendlich für die Produktion hochspezifischer und selektiver Antikörper (oder Immunglobuline, Ig) verantwortlich sind.^[52] Bevor es zur Antikörperproduktion kommen kann, müssen die B-Lymphozyten zunächst aktiviert werden. Nach Bindung des vollständigen Antigens durch den B-Zell-Rezeptor folgt die Internalisierung, Prozessierung und Präsentation der entsprechenden Peptide als Komplex an der Zelloberfläche.^[53-54] Erkennt eine T-Helferzelle ebendiesen Komplex werden Zytokine ausgeschüttet, die die Proliferation und Differenzierung der B-Lymphozyten zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen bzw. B-Gedächtniszellen anregen (**Abb. 2.4**).^[55-56] Jede Plasmazelle ist nur in der Lage einen einzigen Typ von Immunglobulin zu generieren, der spezifisch auf einen bestimmten Abschnitt eines Antigens, das sogenannte Epitop, reagiert.^[57] Insgesamt ist der menschliche Körper dazu in der Lage bis zu 10^8 verschiedene Antikörper zu produzieren.^[58-59]

2. EINLEITUNG

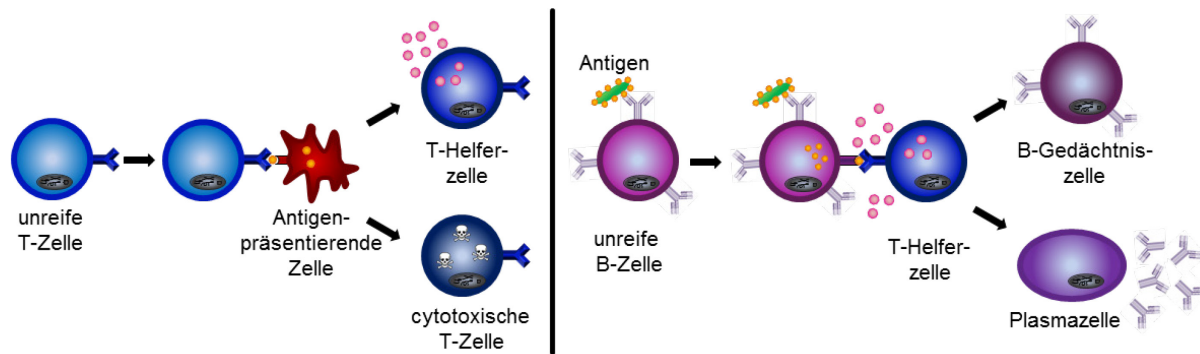


Abbildung 2.4: Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten (links) und B-Lymphozyten (rechts).

Diese Vielfalt ist nötig um auf die immunologische Herausforderung reagieren zu können, dass ständig neue verschiedene Pathogene in den Körper eindringen können. Ermöglicht wird dies durch somatische Hypermutation.^[60-62] Auf diese Weise können immer neue Sequenzen für die antigenbindenden Regionen generiert werden, die im besten Fall eine höhere Affinität für das betreffende Epitop aufweisen. Plasmazellen, die Antikörper mit der gewünschten Spezifität aufweisen, werden daraufhin selektiert, vermehrt zur Teilung angeregt und sezernieren dann entsprechende Antikörper. Im Rahmen dieser Affinitätsreifung können die B-Zellen auch einen Isotypenwechsel vollziehen, was die Produktion anderer Antikörperklassen ermöglicht.^[63] Ein Teil der B-Zellen differenziert auch zu langlebigen Gedächtniszellen.^[64] Diese tragen die genetische Information für die Bildung eines geeigneten Antikörpers gegen ein Pathogen in sich, sodass bei erneuter Infektion mit diesem Erreger schneller eine Immunantwort ausgelöst werden kann. Auf ebendiesem Prinzip beruht auch der Mechanismus der Immunität, auf dessen Basis die Entwicklung von Impfstoffen vorangetrieben wurde.^[65-67]

Die sezernierten Antikörper übernehmen als Teil der humoralen Immunantwort eine Vielzahl zentraler Aufgaben. Im Rahmen des als Neutralisation bezeichneten Vorgangs lagern sich die Immunglobuline an potentielle Pathogene und verhindern so beispielsweise das Einbringen viraler oder bakterieller DNA in körpereigene Zellen. Bei der Opsonierung, also der Umhüllung körperfremder Substanzen, werden durch spezifische Erkennungsmerkmale der Antikörper Makrophagen rekrutiert, die die Fremdstoffe oder -zellen vermehrt aufnehmen und eliminieren.^[68-70] Des Weiteren können die Immunglobuline, im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren, das Komplementsystem aktivieren. Dies führt zu kaskadenartigen Impulsen, im Laufe derer die Zielzelle vermehrt durch Makrophagen angegriffen wird, Entzündungsreaktionen mediiert und Enzyme aktiviert werden, die zur Lyse der Zelle führen.^[71-73]

2.2.1 Klassifizierung von Antikörpern

Die Immunglobuline von Säugetieren lassen sich grob in fünf unterschiedliche Klassen unterteilen. Die Unterscheidung erfolgt anhand der für den jeweiligen Isotypen codierenden DNA-Abschnitte für die schwere Kette (*heavy chain*, HC), namentlich α , γ , δ , ϵ , und μ . Dementsprechend werden die Antikörper als IgA, IgG, IgD, IgE und IgM bezeichnet.^[74] Allen gemein ist der räumliche Aufbau in einer Y-förmigen Struktur, die aus je zwei identischen leichten (*light chain*, LC) und schweren Aminosäureketten gebildet wird.^[75] Ihr Auftreten im Laufe der Immunantwort, die Abundanz sowie die Halbwertszeit im Blutserum als auch die Effektorfunktion der einzelnen Spezies weicht jedoch deutlich voneinander ab. Beispielsweise werden bei einer akuten Infektion die als Pentamer vorliegenden IgM zuerst gebildet und bekämpfen so – unter anderem durch Agglutination und die Aktivierung des Komplementsystems – effektiv vor allem bakterielle Pathogene.^[76] Diese Antikörper können auch als direkte Vorläufer der IgG betrachtet werden, die erst zu einem späteren Zeitpunkt gebildet werden, dafür aber meist eine höhere Spezifität und Affinität zu dem entsprechenden Antigen aufweisen. Mit einem Anteil von bis zu 75 % der Gesamtmenge an Immunglobulinen, handelt es sich hierbei um die am häufigsten im Blutserum zirkulierende Antikörperklasse mit der durchschnittlich längsten Halbwertszeit.^[77-78] Der Einfachheit halber werden im nächsten Abschnitt typische Eigenschaften der IgG am Beispiel humaner und muriner Antikörper diskutiert, da diese über die Jahre am häufigsten und ausführlichsten charakterisiert wurden. IgG-Antikörper existieren in mindestens vier Subtypen, die beim Menschen die Bezeichnung IgG1-4 tragen, bei der Maus hingegen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 (Abb. 2.5).^[79-81]

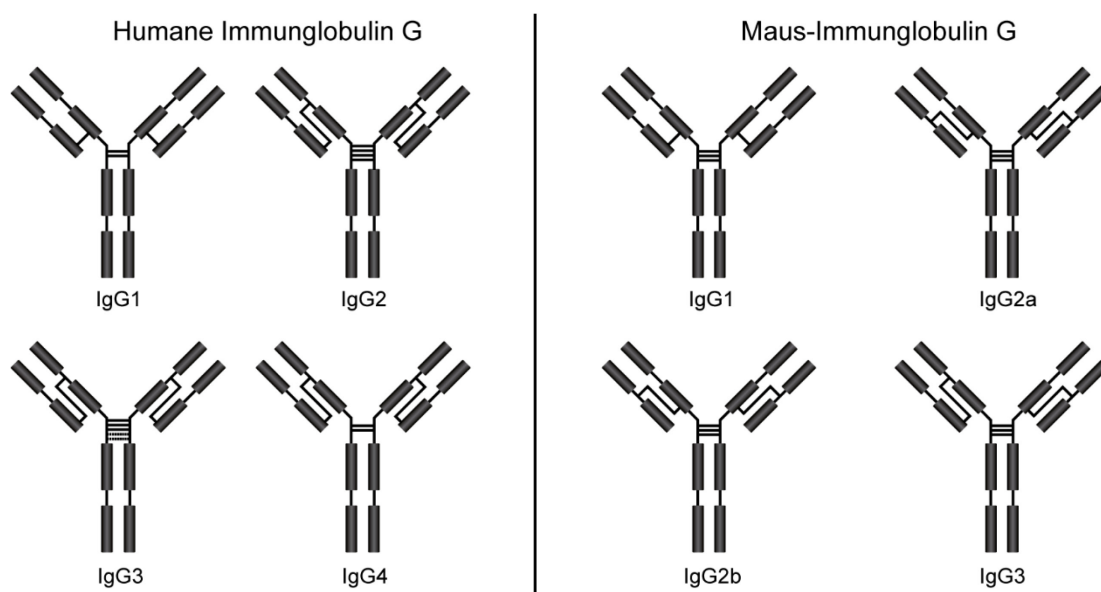


Abbildung 2.5: Schematische Struktur der Interstrang-Disulfidbrücken von humanen und Maus-Immunglobulin G (modifiziert nach Seiler^[82]).

2. EINLEITUNG

Sie alle bestehen, wie bereits erwähnt, aus zwei leichten Ketten mit einer Masse von ca. 25 kDa und zwei schweren Ketten von je ca. 50 kDa, sodass sich für den gesamten Antikörper ungefähr 150 kDa ergibt. Je eine leichte und schwere Kette sind untereinander mittels einer Disulfidbrücke verknüpft.^[83] Abhängig vom Isotyp des Antikörpers befinden sich in der sogenannten Gelenkregion (*hinge region*) der schweren Ketten je bis zu fünf Cysteine (Cys), die beide Polypeptide über Schwefelbrücken verknüpfen. Dies garantiert eine große räumliche Flexibilität, die für die Bindung von Antigenen von entscheidender Bedeutung sein kann. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass vom humanen IgG2 zusätzlich weitere Isoformen existieren, welche sich in der Art der Verknüpfung der Interstrang-Disulfidbrücken unterscheiden.^[84-85] Der grundsätzliche Aufbau eines IgG1 ist schematisch in **Abb. 2.6** gezeigt.

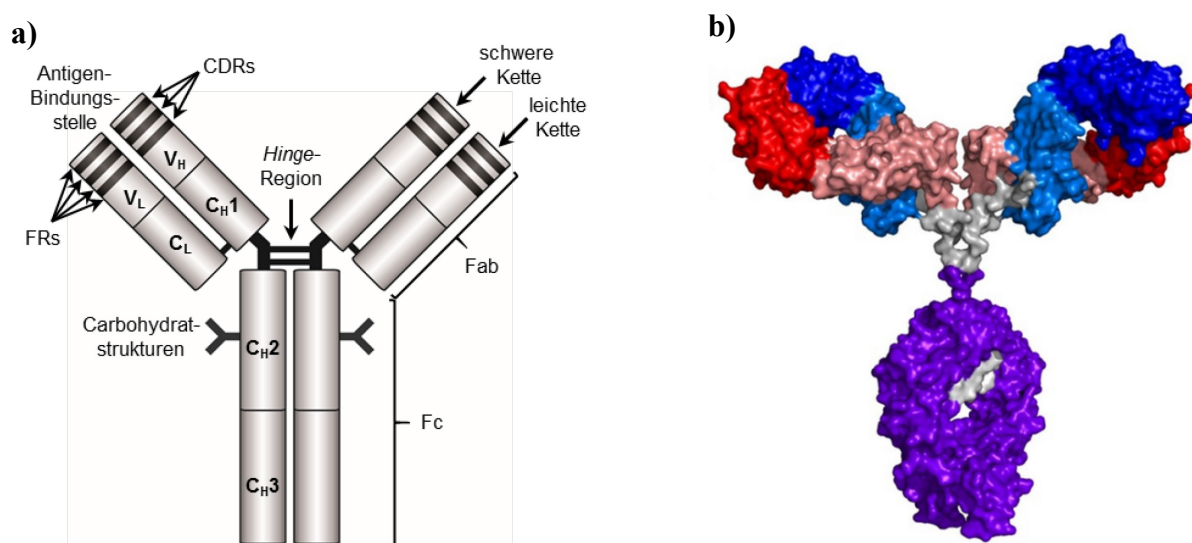


Abbildung 2.6: a) Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers modifiziert nach Killard *et al.*^[86]
b) 3D-Struktur eines Antikörpers basierend auf NMR- und röntgenkristallografischen Daten nach NIST.^[87]

In dem Antikörper liegen sechs verschiedene (also insgesamt zwölf) globuläre Domänen vor, die – stabilisiert durch je eine Cys-Cys-Intrastrangverknüpfung – als Sekundärstruktur β -Faltblätter ausbilden.^[88] Die schwere Kette eines IgG1, mit einer durchschnittlichen Länge von 450 Aminosäuren (AS), kann in vier verschiedene Segmente unterteilt werden. Zunächst unterscheidet man die konstanten Regionen C_H3 und C_H2 (*constant heavy chain*), die gemeinsam mit ihrem jeweiligen Komplement den kristallisierbaren Bereich (*fragment crystallizable*, Fc) des Antikörpers bilden. Der Fc-Teil besitzt unter anderem eine große Bedeutung für die Erkennung von Antikörpern durch den Fc γ -Rezeptor, der z. B. von B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und Makrophagen exprimiert wird.^[89-91] Die Bindung eines mit einem Pathogen assoziierten IgG kann dabei verschiedene Immunreaktionen auslösen, wie beispielsweise die Phagozytose opsonierter Erreger oder die

2. EINLEITUNG

sogenannte antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). In der C_{H2}-Region befindliche Asparagin-gebundene Oligosaccharide haben dabei auch einen erheblichen Einfluss auf die Affinität zum jeweiligen Rezeptor. Die Zuckerstrukturen übernehmen auch noch andere wertvolle Funktionen, die später in **Kapitel 2.2.3** genauer betrachtet werden. Der aminoterminal Teil der HC besteht aus der konstanten C_{H1}- und der variablen V_H-Domäne (*variable heavy chain*), die zusammen mit dem variablen Teil der leichten Kette V_L (*variable light chain*) die Antigenbindungsstelle, das Paratop, bilden. Die leichte Kette besteht insgesamt aus ca. 210 AS und besitzt neben der variablen ebenfalls eine konstante carboxyterminale Domäne C_L (*constant light chain*). Abhängig von der Aminosäuresequenz wird zwischen κ - und λ -Kette unterschieden.^[92] Welche der beiden bevorzugt vorliegt ist zum einen speziesabhängig, zum anderen bestimmt durch den pathologischen Zustand des Individuums. Im Blutserum eines gesunden Menschen beträgt das absolute Mengenverhältnis innerhalb der IgG ungefähr 2:1.^[93-94] Die variablen Domänen (γ V_H \approx 123 AS, κ V_L \approx 108 AS) des Antikörpers lassen sich in vier Gerüstregionen (*framework regions*, FR1-4) sowie drei hypervariable Regionen (*complementary determining regions*, CDR1-3) unterteilen. Während die Gerüstregionen eine nahezu unveränderliche AS-Sequenz aufweisen, garantieren die CDRs mit einer Länge von 9-16 AS die nahezu unbegrenzte Antikörper-Vielfalt, die für die Erkennung verschiedenster antigener Determinanten verantwortlich ist.^[95-96] Die äußerst spezifische und hochaffine Bindung beruht dabei neben der Komplementarität der räumlichen Struktur von Paratop und Epitop (Schlüssel-Schloss-Prinzip) auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen sowie elektrostatischen und van-der-Waals-Wechselwirkungen.

Der Verdau mit verschiedenen Enzymen, die nahe bzw. in der Gelenkregion schneiden, führt zu charakteristischen Fragmenten des Antikörpers. Nach Behandlung eines IgG1 mit Papain werden durch Spaltung oberhalb der Disulfidbrücken der Gelenkregion zwei identische antigenbindende Fragmente (*fragment antigen binding*, Fab) sowie der Fc-Teil mit einer Masse von durchschnittlich je 50 kDa freigesetzt.^[97] Pepsin dagegen schneidet unterhalb der Disulfidbrücken, sodass ein charakteristisches sogenanntes F(ab')₂-Fragment mit einer Masse von ungefähr 100 kDa entsteht, welches unter reduzierenden Bedingungen zu zwei Fab'-Fragmenten gespalten wird. Diese Fragmente besitzen eine leicht größere Masse als die, die durch den Verdau mit Papain entstehen. Der Fc-Teil des Antikörpers wird dagegen in kleine Peptidfragmente zerlegt.^[98]

2. EINLEITUNG

2.2.2 Monoklonale Antikörper

Kommt das Immunsystem mit einem Erreger in Kontakt, werden eine Vielzahl verschiedener Antikörper gebildet, die zwar dasselbe Antigen aber immer unterschiedliche Epitope desselben binden. Diese Antikörper werden als polyklonal bezeichnet.^[99] Immunglobuline sind aufgrund ihrer Selektivität und Spezifität für eine Vielzahl von Anwendung prädestiniert, wie dem Einsatz in der Diagnostik, als Marker oder als Medikament. Daher ist es von Vorteil, wenn nur eine einzige antigene Determinante des Zielmoleküls erkannt wird um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.^[82] Mitte der 1970er Jahre entwickelten KÖHLER und MILSTEIN die sogenannte Hybridomtechnik, die es ermöglicht praktisch unbegrenzte Mengen eines homogenen monoklonalen Antikörpers zu generieren, der ebendiese Anforderungen erfüllt (Abb. 2.7).^[100]

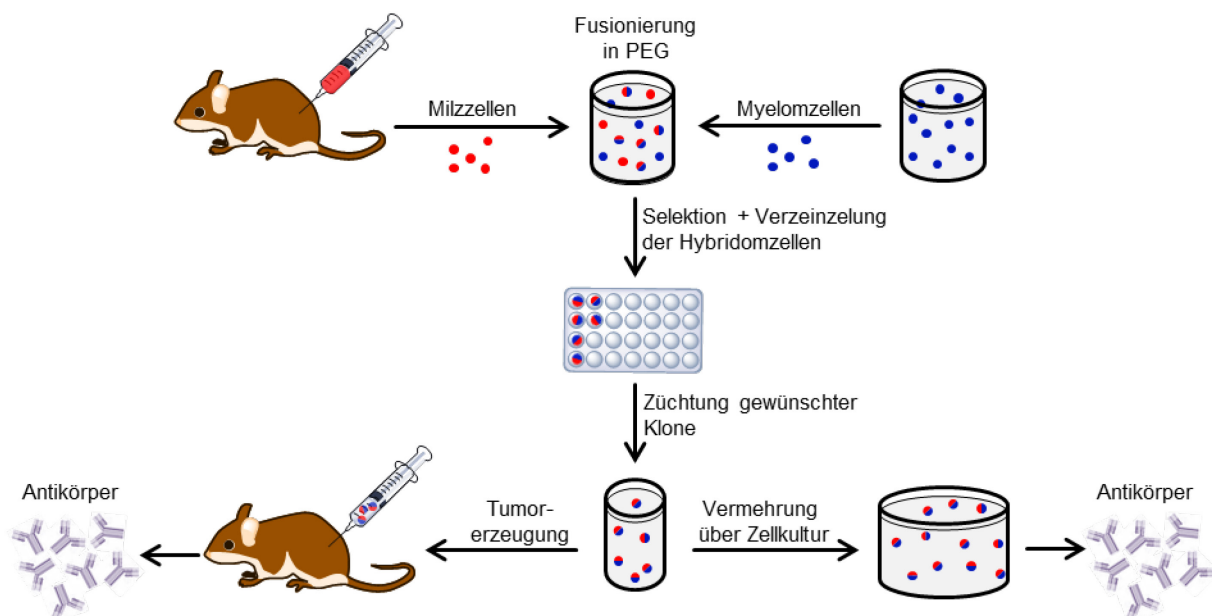


Abbildung 2.7: Generierung und Produktion eines monoklonalen Antikörpers (modifiziert nach STRYER ^[101]).

Der erste Schritt in diesem Prozess stellt hierbei die Immunisierung geeigneter Säugetiere (z. B. Mäuse) dar.^[102] Zu diesem Zweck wird dem Organismus das entsprechende Antigen verabreicht, um die Produktion von spezifischen Antikörper-sezernierenden Plasmazellen anzuregen. Gerade für kleinere Antigen-Moleküle, sehr körperähnliche Strukturen oder synthetische Peptide ist es mitunter hilfreich diese an Trägerproteine, wie beispielsweise BSA, zu koppeln um eine ausreichend starke Immunantwort zu provozieren.^[103] Zur Fortschrittskontrolle der Antikörperproduktion wird dem Versuchstier in regelmäßigen Abständen Serum entnommen und eine Titer-Überprüfung durchgeführt. Die aktivierten Plasmazellen reichern sich vor allem stark in der Milz an, sodass das Tier nach angemessener

2. EINLEITUNG

Zeit geopfert und entsprechende Zellen daraus isoliert werden können. Da diese Plasmazellen jedoch nur eine eingeschränkte Lebensdauer besitzen, ist zur Antikörperproduktion die Fusion mit Myelomzellen unabdingbar. Bei Myelomzellen handelt es sich um maligne entartete Plasmazellen, die sich praktisch unbegrenzt teilen können. Die bio- oder elektrochemische Verschmelzung der beiden Zellen zu Hybridomzellen führt zur Kombination beider Eigenschaften, sodass die Zellen entsprechend zur unbegrenzten Antikörperproduktion zur Verfügung stehen und andererseits auch gut gelagert und jederzeit neu kultiviert werden können. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Fusion ein stochastischer Prozess ist, der nicht immer vollständig abläuft und dabei auch Zellen ohne die gewünschten Eigenschaften in der Mischung vorhanden sind. Mittels HAT-Selektion wird dafür gesorgt, dass sich in entsprechendem Zellkulturmedium ausschließlich Hybridomzellen vermehren, während die anderen absterben. Mit geeigneten Screeningmethoden können die vorher vereinzelteten Zellen, bzw. die von ihnen exprimierten Antikörper, entsprechend auf ihre antigenbindenden Eigenschaften untersucht und beispielsweise mittels Zellkulturverfahren nachproduziert werden. Werden Antikörper in der Humantherapie eingesetzt, ergibt sich eine zusätzliche Herausforderung: Die erstmals als Medikament eingesetzten murinen Antikörper werden vom menschlichen Organismus als Fremdmolekül erkannt und induzieren somit eine Immunantwort. Ohne demnach zielgerichtet ihren Zweck erfüllen zu können, wie bspw. die Markierung von Tumorzellen in der Krebstherapie, werden diese direkt unschädlich gemacht und/oder entsprechende Entzündungsfaktoren mediiert.^[104] Diese Tatsache führte zu der Entwicklung von Chimären aus Maus- und Humanantikörpern, bei denen der variable Teil der HC und LC des Immunglobulins murinen Ursprungs mit dem konstanten Teil eines humanen Antikörpers fusioniert wird.^[105] Bei den in den letzten Jahren zugelassenen Antikörpertherapeutika handelt es sich beinahe ausschließlich um humanisierte oder humane Immunglobuline. Die Produktion ebendieser kann durch Verwendung transgener Mäuse oder unter Einsatz der Phagentechnologie erfolgen.^[106-107]

2.2.3 Posttranslationale Modifikationen

Wie die meisten Proteine haben auch Antikörper nach der reinen Transkription, also der Umsetzung der codierenden DNA- in die Aminosäuresequenz, noch nicht ihre finale Form erreicht. So können nach der reinen Biosynthese noch eine Reihe posttranslatiionaler Modifikationen (PTMs) eingeführt werden. Als wichtigste Vertreter sind hier die Ausbildung von Disulfidbrücken, die dem Immunglobulin überhaupt erst seine typische Y-Form verleihen,

2. EINLEITUNG

sowie verschiedene Glycosylierungen zu nennen, welche einen ganz entscheidenden Einfluss u.a. auf die Stabilität und die Regulation der Effektorfunktionen besitzen.^[108-110] Gerade für monoklonale Antikörper, die gezielt zu einem bestimmten Zweck hergestellt wurden, ist es daher von immenser Wichtigkeit, diese PTMs genau zu charakterisieren. Neben den bereits genannten Modifikationen sind in der Literatur besonders Oxidationen, Deamidierungen, Isomerisierungen, Zyklisierungen, Disulfidbrücken-, „*Scrambling*“ und eine unterschiedliche Anzahl von C-terminalen Lysinresten am Fc-Teil des Antikörpers ausführlich beschrieben.^[111-112] Die Oxidationen von Methionin beispielsweise, die gerade bei längerer Lagerung oder thermischer Belastung auftritt, kann zu Konformationsänderungen und somit ebenso zur Einbuße charakteristischer Eigenschaften führen.^[113] Weniger bekannt ist die Cysteinylierung von Antikörpern, die an ungepaarten Cysteinresten, die nicht an der Ausbildung der globulären Struktur beteiligt sind, auftritt. Diese kann ebenfalls erheblichen Einfluss auf die biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften des Antikörpers haben und seine Aktivität modulieren.^[114]

Glycosylierungen

Durchschnittlich 2 – 3 % der Gesamtmasse eines IgG-Moleküls entfallen auf die Carbohydratstrukturen.^[115-116] Allgemein wird zwischen N-Glycosylierungen an Asparagin und O-Glycosylierungen an Serin oder Threonin unterschieden. Erstere erfordern in der Primärstruktur eine Konsensussequenz der Reihenfolge Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx ≠ Prolin). Für O-glycosidisch gebundene Oligosaccharide, die nach bisherigen Erkenntnissen nur bei den Isotypen IgA1 und IgD auftreten, konnte bisher kein spezifisches Aminosäuremotiv identifiziert werden, ihr Auftreten scheint von einer Vielzahl an Faktoren abhängig zu sein.^[117-118] Alle Immunglobuline besitzen mindestens je eine stark konservierte N-Glycosylierungsstelle in der CH2-Domäne der schweren Kette unterhalb der Gelenkregion. Die Bindung erfolgt üblicherweise am Asp²⁹⁷.^[119-120] Die Zuckerstrukturen liegen dabei nach innen gerichtet zwischen den beiden hydrophoben Taschen der entsprechenden Domänen und unterstützen so die globuläre Struktur des Antikörpers (**Abb. 2.8**). Vielfach wird angenommen, dass dies allgemein zur Erhöhung der Löslichkeit des Immunglobulins sowie der Stabilität gegen proteolytische Spaltung und thermische Belastung führt.^[121-122] Eine der wichtigsten Eigenschaften von IgG, das Auslösen der zellulären Immunantwort, wird ebenfalls stark mit den Glycanstrukturen assoziiert. Wie bereits erwähnt, exprimieren bspw. Makrophagen, Monozyten oder Neutrophile an ihrer Zelloberfläche verschiedene Formen eines Fcγ-

2. EINLEITUNG

Rezeptors, der als Bindungsstelle die CH_2 -Region eines IgG erkennt.^[123] Dafür scheinen die Zucker von immenser Bedeutung zu sein, wie Experimente mit vollständig deglycosylierten Antikörpern zeigten. In diesem Fall wurde keine oder nur eine sehr schwache Effektorfunktion beobachtet.^[124-126] Der Grund dafür liegt wahrscheinlich mehr in der Änderung der Konformation als in dem Verlust der Zuckerstrukturen an sich, da diese selbst kaum mit dem Rezeptor in Wechselwirkung treten. Wichtig für die Erkennung durch den Rezeptor scheint die räumliche Struktur der Domäne zu sein.^[127]

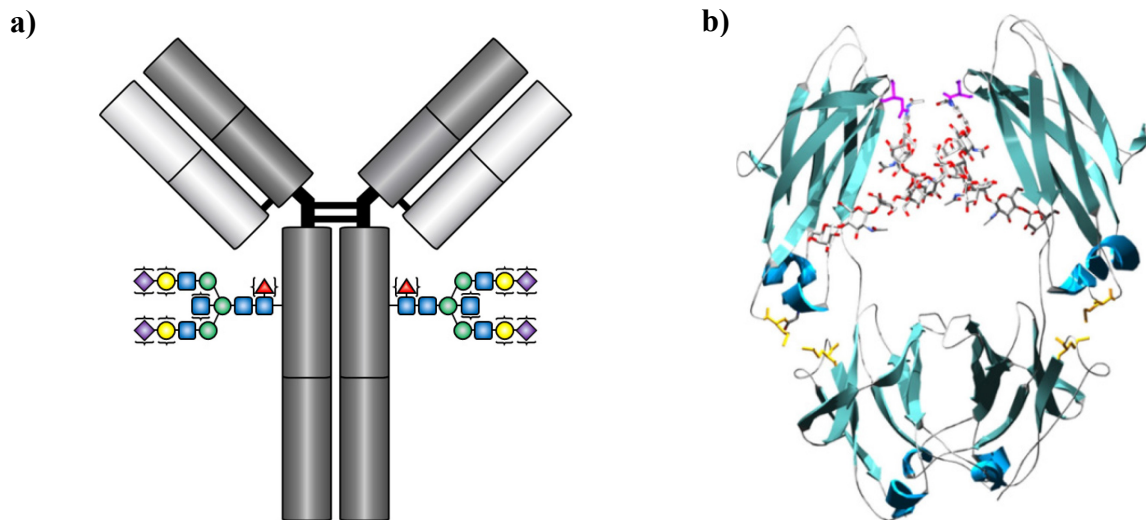


Abbildung 2.8: a) schematische Darstellung eines IgG1 mit möglichen N-glycosidisch gebundenen Zuckerstrukturen. b) Auf NMR- und röntgenkristallografischen Daten basierende räumliche Anordnung der Zuckerstrukturen im Fc-Teil des Antikörpers nach LIU *et al.*^[127]

Des Weiteren besitzt die Fc-Glycosylierung offenbar entscheidenden Einfluss auf die Aggregationsneigung von Antikörpern. LATYPOV *et al.* konnten zeigen, dass deglycosylierte Antikörper nicht nur bei saurem pH-Wert schneller denaturieren, sondern grundsätzlich eine höhere Aggregationsneigung besitzen, was unter Umständen die Funktionalität einschränken kann.^[128] In Bezug auf die Antigenbindungsaktivität konnte dagegen kein Unterschied zwischen glycosyliertem und deglycosyliertem Antikörper festgestellt werden.^[129] Die Oligosaccharide der IgG sind dem biantennären komplexen Typ zuzuordnen. Sie besitzen alle die gleiche Grundstruktur, bestehend aus einem Chitobiosekern (2x N-Acetylglucosamin, GlcNAc, ■), der über die α -1,6-Position fucosyliert (Fuc, ▲) sein kann, drei Mannose- (Man, ●) und wiederum bis zu drei GlcNAc-Resten. Die Man-Reste sind α -1,3- und 1,6-glycosidisch gebunden, alle anderen Zucker sind β -1,4-verknüpft. Das zusätzliche 1,4-gebundene GlcNAc-Monomer wird als *bisecting* GlcNAc bezeichnet. Abhängig von der Anzahl der sich anschließenden Galactose-Einheiten (Gal, ●) unterscheidet man zwischen G0-, G1- und G2-Struktur, bzw. bei Kernfucosylierung G0F, G1F und G2F-Struktur (**Tab. 2.1**). Final kann die

2. EINLEITUNG





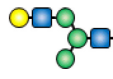
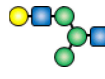


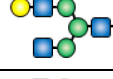
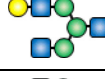


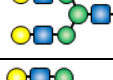
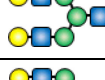
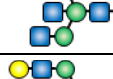
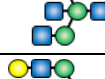
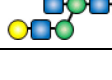
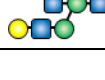
Struktur durch bis zu zwei Sialinsäurederivate, N-Acetylneuraminsäure (NANA, ) und/oder N-Glycolylneuraminsäure (NGNA, ) abgeschlossen werden.^[130] Die Bindung an die Galactose kann entweder über α -2,3- oder α -2,6-Verknüpfung erfolgen. Humane Antikörper besitzen ausschließlich NANA-Reste. Unter anderem ist dies ein Grund dafür, dass bspw. murine Antikörper in der humanen Immuntherapie kaum eingesetzt werden können, da sie eine starke Immunantwort des Organismus provozieren.

Tabelle 2.1: Schematische Struktur, Abkürzung und monoisotopische Massen der massenspektrometrisch detektierbaren Natriumaddukte der häufigsten Glycanstrukturen.

	Name	MW [Da]	m/z (Na ⁺)		Name	MW [Da]	m/z (Na ⁺)
	G0(-gn)	1113,4072	1136,3964		G0F(-gn)	1259,4651	1282,4543
	G1(-gn)	1275,4600	1298,4492		G1F(-gn)	1421,5179	1444,5071
	G0	1316,4865	1339,4757		G0F	1462,5445	1485,5337
	G1	1478,5394	1501,5286		G1F	1624,5973	1647,5865
	G0gn	1519,5659	1542,5551		G0Fgn	1665,6238	1688,6130
	G2	1640,5922	1663,5814		G2F	1786,6501	1809,6393
	G1gn	1681,6187	1704,6079		G1Fgn	1827,6767	1850,6659
	G2gn	1843,6716	1866,6608		G2Fgn	1989,7295	2012,7187

Durch die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der Monosaccharide und die Tatsache, dass die beiden schweren Ketten unterschiedliche Glycosylierungsmuster besitzen können, ergibt sich eine immense potentielle Mikroheterogenität innerhalb einer Generation desselben funktionalen Antikörpers.^[131] Bei Untersuchungen im menschlichen Organismus zeigte sich, dass hoher Sialyierungsgrad mit einer stark entzündungshemmenden Funktion der IgG einhergeht, während der gegenteilige Zustand zur Erhöhung der antikörperabhängigen zellvermittelten Toxizität (ADCC) und anscheinend auch der Löslichkeit führt.^[132-133] Kernfucosylierung wiederum reduziert die ADCC des IgG-Moleküls. Abgesehen von der hochkonservierten Glycosylierungsstelle im Fc-Bereich besitzen ca. 20 % aller humanen Immunglobuline weitere Zuckerstrukturen im Fab-Teil. Es wird unter anderem vermutet, dass diese Strukturen die Autoaggregation von IgG medieren. Oft geht eine starke Galactosylierung in diesem Bereich mit einer reduzierten Galactosylierung der Fc-gebundenen Carbohydrat-

2. EINLEITUNG

Struktur einher.^[134] Anhand der Art der Glycosylierungsmuster lassen sich auch Rückschlüsse auf den Zustand des jeweiligen Organismus ziehen. Bei einer Vielzahl autoimmuner Erkrankungen wird eine deutliche Änderung des allgemeinen Glycosylierungszustands im Vergleich zu dem eines gesunden Menschen beobachtet. Als gutes Beispiel eignet sich dafür das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis, welches offenbar mit einer starken Reduzierung der Galactosereste an IgG einhergeht. Während der Schwangerschaft, in der entsprechende Patientinnen deutlich weniger ausgeprägt unter den Symptomen der Krankheit litten, konnte entsprechend ein starker Anstieg der Antikörper-Galactosylierung beobachtet werden.^[135]

2.2.4 Cisplatin-DNA-spezifischer Ratten-Antikörper (cPAK)

Bei dem in dieser Arbeit charakterisierten Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen IgG, der durch Immunisierung von Ratten gewonnen wurde.^[2] Im Gegensatz zu Mäusen sind diese körperlich wesentlich robuster und liefern zudem eine ca. 10-fach größere Menge an Serum, was die Handhabung deutlich vereinfacht.^[136] Dazu wurde zunächst Kalbsthymus-DNA *in vitro* mit Cisplatin behandelt, elektrostatisch an Rinderserumalbumin (*Bovine serum albumin*, BSA) gekoppelt, und den Ratten wiederholt intraperitoneal appliziert. Der zusätzliche Zwischenschritt der Kopplung erwies sich als notwendig, da die Cisplatin-induzierte Änderung in der DNA-Struktur allein nicht ausreicht, um sie als potentiell Pathogen zu erkennen und eine dementsprechend starke Immunantwort auszulösen.^[137] Dabei ist zu beachten, dass diese Methode zu Kreuzreaktivitäten des Antikörpers mit BSA führen kann. Die Antikörperaktivität in den Rattenserum wurde nach der Methode von SUNDQUIST *et al.* getestet, die Ratten dementsprechend ausgewählt und deren antikörpersezernierende Milzzellen isoliert.^[138] Durch Isolation und Fusionierung mit Myelomzellen nach der Methode von MILSTEIN *et al.* wurden Hybridomzellen geschaffen, die eine unbegrenzte Produktion der Antikörper garantieren.^[100] Einzelne Zellklone, die den gewünschten Antikörper produzieren, wurden danach über Cisplatin-DNA-beschichtete magnetische Kügelchen (*Magnetic Beads*) isoliert und in einem serumfreien Zellmedium kultiviert.^[139-140] Die Reinigung der Antikörper erfolgte in zwei Schritten, über hydrophobe Interaktionschromatographie gefolgt von einer Affinitätschromatographie mittels Protein G-Säulen. Im Zuge einer retrospektiven Charakterisierung wurde die Adduktspezifität des monoklonalen Antikörpers mittels „*Immuno-trapping*“ überprüft und Pt(GG)-Läsionen als bevorzugtes Antigen identifiziert. Im Gegensatz zu anderen bis dato gegen Cisplatin-DNA-Addukte gerichteten Antikörper, eignet sich der cPAK nicht nur zum qualitativen sondern auch quantitativen Nachweis platinierter DNA auf

2. EINLEITUNG

Einzelzellniveau sehr gut.^[138, 141] Seitdem findet er im Labor von J. THOMALE routinemäßigen Einsatz in immunzytologischen Assays (*Immune-cytological assay, ICA*).^[142-143] In seiner Dissertation konnte M. ZIEHE zudem zeigen, dass sich ein kompetitiver ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) bis zu einer gewissen Konzentration gut dazu eignet den Cisplatin-Adduktgehalt einer Probe abzuschätzen.^[41] Außerdem kann der cPAK auf einer Säule immobilisiert werden und somit zur affinitätschromatographischen Reinigung platinierter DNA dienen. Die qualitative und quantitative Analytik ergab eine starke Anreicherung von Pt(GG)-Addukten. Es ist jedoch nach wie vor nicht abschließend geklärt, ob sich die Aktivität tatsächlich ausschließlich gegen ebendiese Addukte richtet. Aufgrund der Art des Immunisierungsprozesses (mit langkettiger genomischer DNA) lässt sich vermuten, dass die globale Verzerrung der DNA-Struktur durch die Verknüpfung der Basen über Cisplatin eine entscheidende Rolle spielt. Dies wiederum setzt auch eine gewisse Mindestlänge der DNA voraus. Der Einsatz gezielt platinierter Oligonukleotidsequenzen und die Charakterisierung der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe könnten hier weitere Erkenntnisse zur Bindungsspezifität beitragen.

Mittels Isotypisierung konnte der Antikörper der IgG2a-Klasse und damit des am häufigsten im Blutserum von Ratten vorkommenden Typs zugeordnet werden.^[144-145] Bei der LC handelt es sich mit 95 %-iger Wahrscheinlichkeit um eine κ -Kette.^[146] Die typische AS-Sequenz eines Ratten-IgG2a in der Gelenkregion enthält zwei Cysteinreste, die die schweren Ketten kovalent miteinander verknüpfen.^[147] Zusammengenommen mit zwölf domänenbildenden und zwei Interstrang-Disulfidbrücken (HC*LC) ergibt sich eine Gesamtzahl von 16 reduktiv spaltbaren Cys-Cys-Bindungen. Im direkten Vergleich weisen Ratten-IgG2a allgemein eine starke Homologie zu Maus-IgG1 bzw. zu humanen IgG4 auf.^[148-149] Genauere Studien mit verschiedenen Ratten-Antikörpern zeigten unterschiedliches Ansprechverhalten auf enzymatische Verdauung oder Reduktion.^[150] So werden IgG2a unter reduktiven Bedingungen vor allem in zwei HC*LC-Fragmente gespalten. Die Disulfidbrücken der Gelenkregion scheinen demnach labiler als die übrigen zu sein.^[151] Gegen Trypsin scheinen ebendiese Antikörper dagegen eine relativ hohe Resistenz zu besitzen. Erst nach längerer Inkubationszeit wird vermehrt die Bildung eines ca. 13 kDa schweren Fragments beobachtet, das der variablen Region der schweren Kette (V_H) zugeordnet wird.^[152-153] RAJU *et al.* untersuchten CH₂-gebundenen Glycane einiger kommerzieller IgG und fanden dabei für Ratten-Antikörper einen Zuckeranteil von 1,6 % der Gesamtmasse. Als häufigste Carbohydrate wurden die kernfucosylierten Strukturen G0F und G0Fgn gefunden. Allgemein liegt der Sialylierungsgrad sehr niedrig, es wurden allerdings sowohl NANA als auch NGNA-Reste nachgewiesen.

2. EINLEITUNG

Letztere liegen mit 0,2 % zehnmal häufiger vor als entsprechende NANA.^[154]

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Firma ALDEVRON mit der Aufklärung der Antikörpersequenz beauftragt.^[155] Die Sequenzierung wurde auf DNA-Ebene durchgeführt. Dementsprechend wurden der Firma Hybridomzellen zugeschickt, deren DNA extrahiert, analysiert und die ermittelte Basenreihenfolge anschließend in die Aminosäuresequenz für die leichte und schwere Kette übersetzt. Die Ergebnisse der Analytik sind in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst. Der vollständige Sequenzierungsreport befindet sich im Anhang.

Leichte Kette									
MMAAVQLLGL LLLWVPALRC									
DIQMTQSPSL	LSASVGDRV	FNCKAGQSIY	KSLNWHYQKL	GEAPKLLIYN	TNNLQTGVPS				
RFSGSGSGTD	YTLTISSLQP	EDFGTYFCFQ	HHSWPDTFGA	GTKLELKRAD	AAPTVSIFPP				
STEQLATGGA	SVVCLMNNFY	PRDISVKWKI	DGTERRDGV	DSVTDQDSK	STYSMSSTLS				
LTKADYESHN	LYTCEVVHKT	SSSPVVKSFN	RNEC						
Schwere Kette									
MAVLVMLLCL VTFPSCVLS									
QVQLKESGPG	LVQPSQTL	TCTVSGFSLN	NYGLSWVRQP	PGKLEWIAA	ISSGGRTFY				
SILKSR	LDTSQS	KMNSLQ	AIYFCSR	GKYGGPWY	QGMVTVSSA				
ETTAPSVYPL	APGSAAQTNS	MVTLGCLVKG	YFPEPVTVTW	NSGSLSSGVH	TFFAVLQSDL				
YTLSSSVTVP	SSTWPSETVT	CNVAHPASST	KVDKKIVPRD	CGCKPCICTV	PEVSSVFIFP				
PKPKDVL	LTPKVTCVVV	DISKDDPEVQ	FSWFVDDDEV	HTAQTQPRE	QFNSTFRSVS				
ELPIMHQDWL	NGKEFKCRVN	SAAFPAPIEK	TISKTKGRPK	APQVYTIPPP	KEQMAKDKVS				
LTCMITDFFP	EDITVEWQWN	GQPAENYKNT	QPIMDTDGSY	FVYSKLVNQK	SNWEAGNTFT				
CSVLHEGLHN	HHTKSLSHS	PGK							

Abbildung 2.9: Aminosäuresequenz der HC und LC des cPAK laut ALDEVRON.^[155] Die Gelenkregion zwischen Position 217-229 und die Glycosylierungssequenz an Position 293-295 sind hervorgehoben. Die CDRs sind in grün, die FRs in blau dargestellt und das jeweilige Signalpeptid in grau gehalten.

Ohne Signalpeptid besitzt die schwere Kette demnach eine Länge von 443, die leichte Kette von 214 Aminosäuren. Damit liegt die erwartete Gesamtmasse des Antikörpers unter Vernachlässigung der PTMs bei 144.488,5 kDa (MW_{LC} : 23.567,2 kDa, MW_{HC} : 48.677,1 kDa). Anders als in bisheriger Literatur angegeben, befinden sich laut ALDEVRON vier Cysteine im Bereich der Gelenkregion, was prinzipiell die Bildung von einer Interstrang-HC-LC- und drei Interstrang-HC-Disulfidbrücken ermöglicht.^[148] Dies entspricht vom Aufbau eher einer γ_1 - als einer γ_{2a} -Kette. Auch ein näherer Blick auf die Region rund um das Glycosylierungsmotiv weist im Vergleich zu der von M. BRÜGGEMANN publizierten Sequenz für Ratten-IgG2a einige Unterschiede auf.^[147, 156] Dies überrascht, da es sich jeweils um Abschnitte des konstanten Teils des Antikörpers handelt und oftmals davon ausgegangen wird, dass dieser sich innerhalb einer Spezies und Subklasse nicht oder nur kaum unterscheidet. Der besseren Übersicht halber sind entsprechende Sequenzabschnitte in **Abb. 2.10** übereinandergelegt.

2. EINLEITUNG

<u>Hinge-Region</u>			<u>AS-Position</u>
ALDEVRON		VPRD CGCKP CICT	217-229
BRÜGGEMANN	γ_{2a}	VPRE CNPF CGCT	216-226
BRÜGGEMANN	γ_1	VPRN CGGDCKP CICT	216-230
<u>Glycosylierungssequenz</u>			
ALDEVRON		PREEQF NST FRS	287-298
BRÜGGEMANN	γ_{2a}	APEKQS NST LRS	286-297
BRÜGGEMANN	γ_1	PPEEQF NST FRS	290-301

Abbildung 2.10: Direkter Vergleich der Sequenz des Antikörpers nach ALDEVRON mit der eines Ratten-IgG2a nach BRÜGGEMANN *et al.* im Bereich der Gelenkregion und der Stelle um das Glycosylierungsmotiv.^[147]

Es ist bereits seit längerem bekannt, dass die antikörperproduzierenden Hybridomzellen genetische Instabilitäten aufweisen können. Das heißt, es kann durch längere Lagerdauer oder im Rahmen der Klonierung der Zellen, vor allem in kontinuierlich laufenden Zellkultursystemen, zu Veränderungen der DNA-Sequenz kommen, die wiederum zu Änderungen in der Primärstruktur des sezernierten Antikörpers führen kann. Als Beispiele hierfür sind spontane Punktmutationen, Insertionen bzw. Deletionen oder Neuordnungen der Gensequenzen (*gene rearrangements*) zu nennen.^[157] Es besteht daher stets Interesse daran, die gesamte Antikörpersequenz zu kennen um in dieser Hinsicht Aussagen treffen zu können.

2.3 Massenspektrometrie

2.3.1 Ionisationsmethoden

Die Massenspektrometrie (MS), deren Grundlagen bereits Anfang des letzten Jahrhunderts entwickelt wurden, zählt inzwischen zu den wichtigsten, vielfältigsten und mit am häufigsten eingesetzten physikalisch-chemischen Analyseverfahren. So wird sie nicht nur zur Qualifizierung und Quantifizierung bekannter Moleküle, sondern auch zur Identifizierung, Strukturaufklärung und Untersuchung molekularer Eigenschaften wie bspw. Bindungsstärken oder Moleküldynamiken (vgl. H-D-Austausch-Experimente) eingesetzt.^[158] Die Entwicklung sogenannter sanfter Ionisationstechniken wie die Elektrospray-Ionisation (ESI) und die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation*, MALDI) war hierbei von entscheidender Bedeutung, da ab diesem Zeitpunkt auch große

2. EINLEITUNG

Biomoleküle weitgehend zerstörungsfrei in die Gasphase gebracht und anschließend massenspektrometrisch charakterisiert werden können.^[159-161] Die Ionisation mittels Elektrospray erzeugt meist mehrfach geladene Ionen. Je nach angelegter Spannung werden entweder positiv geladene Protonen-, Natrium- und/oder Kaliumaddukte oder negativ geladene Quasimolekülonen gebildet. Die Kopplung eines hochauflösenden Trennverfahrens wie der Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) oder der Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) erleichtert die Analyse komplexer Proben.^[162] Üblicherweise werden Mischungen aus Wasser und leicht flüchtigen organischen Lösungsmitteln verwendet, um eine effiziente Desolvatisierung der Analyten zu gewährleisten. Für den mechanistischen Ablauf des Elektrospray-Ionisationsprozesses existieren verschiedene Modellvorstellungen, wobei zwei favorisiert werden. (**Abb. 2.11**).

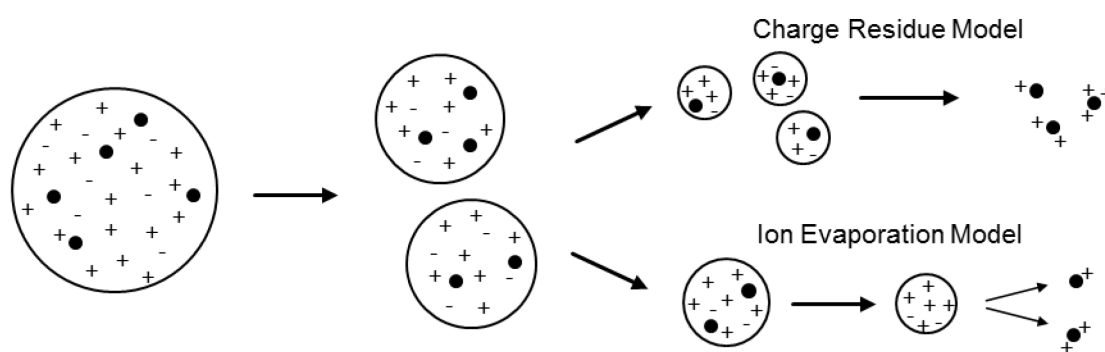


Abbildung 2.11: Mechanismen für den ESI-Ionisationsprozess (CRM nach DOLE und IEM nach THOMSON).

Nach dem von DOLE entwickelten *Charge Residue Model* (CRM) entstehen aus einem geladenen Tröpfchen durch wiederholte Coulombexplosionen viele kleine, bis nur je ein geladenes solvatisiertes Molekül übrig bleibt.^[163] In von THOMSON vorgeschlagene *Ion Evaporation Model* (IEM) hingegen verkleinern sich die Tröpfchen durch Lösungsmittelverdampfung immer stärker, bis aufgrund der sich zunehmenden abstoßenden Ladungen an der Oberfläche bei Erreichen des Rayleigh-Limits spontan Ionen emittiert werden.^[164] Untersuchungen mit mehrfach geladenen Spezies haben gezeigt, dass große Moleküle ($MW \geq 3$ kDa) mit großer Wahrscheinlichkeit über den CRM-Mechanismus ionisiert werden. Diese Annahme beschränkt sich dabei nicht nur auf globuläre Proteine, wie beispielsweise Antikörper, sondern scheint auch für große lineare Moleküle wie Polyethylenglykole (PEG) zu gelten.^[165]

Das Problem des verhältnismäßig hohen Probenverbrauchs bei Verwendung einer normalen ESI-Quelle (bei Kopplung mit herkömmlichen HPLC-Systeme Flussraten bis zu 1 mL/min), konnte durch Entwicklung der nano-ESI überwunden werden. Durch Einsatz einer

2. EINLEITUNG

metallbeschichteten Glaskapillare lassen sich Messungen mit weniger als 5 μL einer Probe im nanomolaren Konzentrationsbereich durchführen.^[166] Die Methode bietet jedoch noch weitere Vorteile: Die im Sprühprozess gebildeten Tröpfchen sind deutlich kleiner als bei der klassischen ESI, sodass die Desolvatisierung schneller und schonender vonstattengeht. Dies macht sich vor allem bei labilen Biomolekülen oder nicht-kovalenten Komplexen bemerkbar, die mit deutlich höherer Effizienz in das Massenspektrometer eingebracht werden können. Aus der entsprechend höheren Ionenausbeute resultieren wesentlich intensivere Signale, die die Analytik erleichtern. Außerdem zeigte sich eine deutlich größere Toleranz gegenüber Salzen in der Probelösung. So können Analyten ohne den Zusatz organischer Lösungsmittel direkt aus rein wässrigen Systemen effizient analysiert werden.^[167] Dies kann nicht nur den Aufwand der Probenvorbereitung erheblich reduzieren, sondern bietet auch erhebliche Variationsmöglichkeiten für den Einsatz unterschiedlichster Lösungsmittel- und Pufferkombinationen. SHARAWY *et al.* konnten erst kürzlich den Desolvatationsmechanismus anhand eines DNA-Duplex nachvollziehen und dabei zeigen, dass die native räumliche Struktur sehr lange erhalten bleibt.^[168] Unterstützt wird dies durch Natriumkationen, die sich in der kleinen Furche der DNA anlagern. Erst die vollständige Entfernung aller Lösungsmittelmoleküle führt zur Denaturierung. Es wird angenommen, dass sich dieser Mechanismus auch auf andere Kationen wie NH_4^+ übertragen lässt. Dies ist besonders für die sogenannte native Massenspektrometrie von Bedeutung, bei der oft Ammoniumacetat (NH_4OAc) als Puffersubstanz eingesetzt wird, um annähernd physiologische Bedingungen zu simulieren (zu nativer MS siehe **Kapitel 2.3.3**). Einer weitläufigen und routinemäßigen Anwendung der nano-ESI stehen aber nach wie vor einige Schwierigkeiten gegenüber, so stellen unter anderem die Automatisierbarkeit und auch die schwankende Qualität der verwendeten nano-ESI-Emitter ein noch ungelöstes Problem dar.^[169]

Im Gegensatz zu ESI werden bei MALDI nahezu ausschließlich einfach geladene Molekülionen gebildet.^[170] In der Proteomforschung ist MALDI aufgrund der leichten Durchführung, Schnelligkeit, Empfindlichkeit und hohen Robustheit weit verbreitet. Zudem verträgt MALDI im Vergleich zur konventionellen ESI einen verhältnismäßig hohen Grad an Kontamination in der Probe.^[171] Trotz allem ist darauf zu achten, dass die Konzentration an Puffern und/oder Detergenzien in der Probe nicht zu hoch ist, da sonst die notwendige Cokristallisation mit der Matrix Probleme bereitet. Die Probenvorbereitung von Oligonukleotiden bedeutet hier etwas mehr Aufwand, da diese aufgrund des negativ geladenen Phosphatrückgrats eine sehr hohe Affinität zu Alkalimetallionen besitzen, was zu komplexen Adduktspektren mit vergleichsweise niedrigen Intensitäten für die einzelnen Spezies führen

2. EINLEITUNG

kann.^[172] Gerade in den letzten Jahren ist auch die Forschung zu den unterschiedlichen Zuckerstrukturen an Glycoproteinen mittels MALDI-MS stark vorangetrieben worden.^[173] Wie bereits erwähnt, besitzen die Glycane einen erheblichen Einfluss auf die Struktur und Funktion von Proteinen und können bspw. als Biomarker für den Gesundheitszustand eines Individuums genutzt werden (vgl. **Kapitel 2.2.2**, Glycosylierungen). Neben der Analytik der gebundenen Glycanstrukturen, besteht auch die Möglichkeit der vorherigen Abspaltung mittels Glycosidasen. Die abgespaltenen neutralen Oligosaccharide lassen sich sehr gut im positiven Modus ionisieren. Es werden nahezu ausschließlich stark abundante Natriumaddukte detektiert.^[174] Die Analytik sialylierter Verbindungen gestaltet sich schwieriger, da gerade bei positiver Ionisation viele verschiedene Alkalimetalladduktspezies gebildet werden, die die Sensitivität beeinträchtigen. Sowohl der Wechsel zu negativer Spannung als auch (zusätzliche) Derivatisierung, und damit Reduktion der Acidität der Sialinsäurederivate (NANA/NGNA), bspw. durch Methylierung der freien Carboxygruppen, führen zu einer Verbesserung der Signalintensität.^[175] Üblicherweise werden die Oligosaccharide vor der MALDI-Analytik noch mittels HPLC, Festphasenextraktion- oder graphitaktivierter Mini-Säulen von den restlichen Probenbestandteilen abgetrennt.^[176] PENG *et al.* konnten zeigen, dass sich eine sialylierte Glycanstruktur im negativen Modus im Vergleich zur Messung im positiven Modus nach Methylierung der freien Carboxygruppe ähnlich gut nachweisen lassen.^[175] Soll nur mit positiver Ionisation gearbeitet werden, bietet sich die vorherige Derivatisierung der Sialinsäuren an, da dies mit einer deutlichen Steigerung der Signalintensität der sialylierten Zuckerstrukturen im Vergleich zu den neutralen einhergeht und somit die Nachweisempfindlichkeit erhöht.

2.3.2 Massenanalysatoren

Nach erfolgreicher Ionisation müssen die Ionen in einem Massenanalysator entsprechend ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses aufgetrennt werden. Gerade MALDI wird sehr gerne in Kombination mit Flugzeit-Massenspektrometern (Time-of-Flight, ToF) eingesetzt, da diese prinzipiell keiner Beschränkung bezüglich der maximal detektierbaren Massen unterliegen. So können sehr große und verhältnismäßig gering geladene Biomoleküle mit zufriedenstellender Präzision analysiert werden.^[177] Ionenfallen (*ion trap*, IT) bieten die Möglichkeit Ionen zu speichern und gezielt zu entlassen, weshalb sie oft in Kombination mit anderen Analysatoren als Massenfilter eingesetzt werden.^[178] Eine deutlich höhere Auflösung und ausgezeichnete Massengenauigkeit bieten Geräte, bei denen die Ionen simultan „eingefangen“ und detektiert

2. EINLEITUNG

werden können, wie Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz- (*Fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR) und Orbitrap-Massenanalysatoren.^[179-180] Die Ionen werden in diesem Fall durch Anlegen eines magnetischen bzw. elektrischen Felds auf eine bestimmte Umlaufbahn gelenkt und erzeugen dabei entsprechend ihres m/z -Werts eine spezifische Frequenz.^[181]

Tandem-Massenspektrometrie

Mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS oder MSⁿ), also der Kopplung mehrerer massenspektrometrischer Ereignisse, kann die Selektivität und Sensitivität einer Analyse beträchtlich verbessert werden. Grundsätzlich werden zunächst die gewünschten Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses (Vorläuferionen) selektiert, im nächsten Schritt gezielt fragmentiert und anschließend die Produktionen in einem zweiten Massenanalysator detektiert.^[158] Man unterscheidet dabei zwischen zeitlicher (*tandem-in-time*) und räumlicher (*tandem-in-space*) Tandem-Massenspektrometrie. Bei ersterer finden alle drei Ereignisse zeitlich versetzt in demselben Analysator statt. Sowohl Ionenfallen- als auch FT-ICR-Geräte bieten durch das *Trapping* von Ionen diese Möglichkeit, sodass – abhängig von der Intensität der Produktionen – die Fragmentierungsexperimente theoretisch unendlich oft wiederholt werden können. Bei *tandem-in-space*-Geräten hingegen erfolgt die Auswahl der Vorläuferionen in einem ersten Massenanalysator, in einer zwischengeschalteten Kollisionszelle werden die Ionen fragmentiert um anschließend mittels eines zweiten räumlich getrennten Massenanalysators nachgewiesen zu werden. Damit sind ohne großen Aufwand nicht nur Produktionen-, sondern auch Vorläuferionen- oder auch Neutralverlustscans möglich. Besonders zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen und Peptiden werden zu diesem Zweck gerne Triple-Quadrupol- (QqQ-) oder Hybrid-Massenspektrometer wie Ionenfallen-FT-ICR-Geräte eingesetzt.^[171] Doch auch im Bereich der Untersuchung von Oligosacchariden und DNA- bzw. RNA-Sequenzen ist die Tandem-Technik nicht mehr wegzudenken.^[182-183] Die Basis für den Einsatz in jeglicher Sequenzanalytik liegt in dem Auftreten spezifischer intramolekularer Bindungsspaltung, die je nach Art der gewählten Fragmentierungsart variieren kann (**Abb. 2.12**). Je nach Massenspektrometer stehen hierbei verschiedene Methoden zur Verfügung. In der Proteomforschung ist die stoßinduzierte Dissoziation (*collision induced dissociation*, CID) am weitesten verbreitet. Stöße mit gasförmigen Neutralteilchen wie Helium, Argon oder Stickstoff, führen zu Peptidbindungsbrüchen entlang des Polymerrückgrads und somit zur Ausbildung von

2. EINLEITUNG

vornehmlich b- und y-Fragmenten.^[184] Bei der Infrarot-Multiphotonendissoziation (IRMPD) und der Hochenergie-Stoßaktivierung (*higher energy collisional induced dissociation*, HCD), werden ebenfalls hauptsächlich b- und y-Ionen gebildet, während bspw. mittels Elektroneneinfangdissoziation (*electron capture dissociation*, ECD) und Elektronentransferdissoziation (*electron transfer dissociation*, ETD) eher c- und z-Fragmente produziert werden.^[185-186]

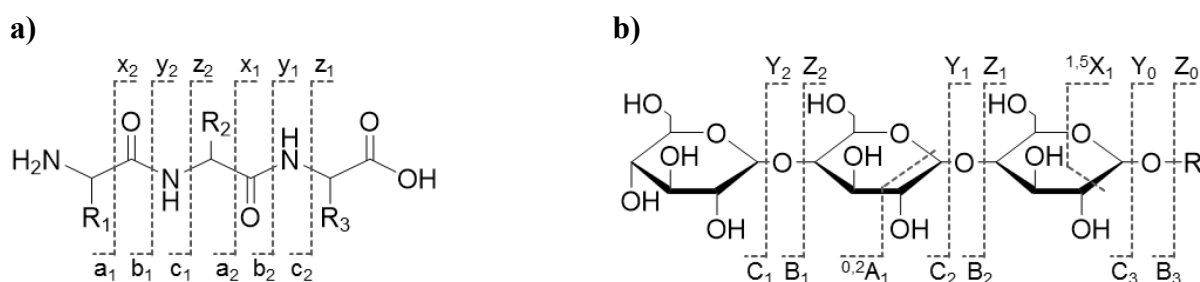


Abbildung 2.12: Nomenklatur der Fragmentierung von **a)** Peptiden nach ROEPSTORFF und FOHLMAN^[187] und **b)** Oligosacchariden nach DOMON und COSTELLO.^[188] Je nachdem wo die Ladung nach Spaltung verbleibt, werden die entstehenden Ionen als a-, b-, c- bzw. x-, y-, z-Fragmente bezeichnet.

Die Fragmentierung von Oligosacchariden mittels CID führt hauptsächlich zur Spaltung der labilsten Bindung innerhalb der Struktur, also der N-glycosidischen Bindung zwischen den einzelnen Zuckermomeren. Es kann jedoch auch zu Spaltungen innerhalb des Zuckerrings (*Cross-ring fragmentation*) kommen.^[189] Bei Alkalimetalladdukten, die hauptsächlich bei der Analytik von Glycanen mittels MALDI-MS vorliegen, werden entsprechende interne A- bzw. X-Fragmente allerdings eher selten beobachtet.^[190]

Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen

In Kombination mit analytischen Trennverfahren wie Gelelektrophorese oder HPLC hat sich die Massenspektrometrie als Methode der Wahl zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen etabliert.^[171] Prinzipiell wird dabei zwischen zwei Herangehensweisen unterschieden. Die *Bottom-up*-Methode wird am weitaus häufigsten verwendet. Sie basiert auf der proteolytischen Erzeugung von Peptiden aus Proteinen, je nach Komplexität der Probe Anwendung mehrdimensionaler Trennverfahren, sowie anschließender Analytik mittels MSⁿ. Als Protease wird bevorzugt Trypsin eingesetzt, da sie sehr robust ist, eine hohe Spezifität besitzt und aufgrund der relativen Häufigkeit der spezifischen Schnittstellen (nach Lys/Arg) Peptide mit einer durchschnittlichen Länge von 8-12 AS erzeugt. Die Peptide besitzen damit nicht nur häufig gut massenspektrometrisch detektierbare m/z-Werte, es werden auch

2. EINLEITUNG

hauptsächlich intensive y-Fragmentserien gebildet, die die Interpretation der MS/MS-Spektren erleichtern.^[191] Für kleine, wenig verunreinigte Proteine bietet sich die Charakterisierung mittels Peptidmassenfingerprint (PMF) an, da diese Methode sehr schnell und einfach ist. Unter Berücksichtigung der spezifischen enzymatischen Schnittstellen werden die Massen der theoretischen Peptide berechnet, mit den gemessenen verglichen und das Protein anhand der Übereinstimmung identifiziert.^[192] Eine höhere Sicherheit bietet das Peptidfragmentfingerprint (PFF), was auf der zusätzlichen Bewertung von MS/MS-Spektren der spezifischen Peptide beruht. Die Datenauswertung kann entweder manuell oder automatisiert mithilfe von speziellen Such-Algorithmen wie SEQUEST oder Mascot erfolgen.^[193-195] Voraussetzung dafür ist allerdings immer, dass die Sequenz der gesuchten Proteine bekannt ist, sodass theoretisch erzeugte bzw. in der Datenbank vorhandene Massenspektren der Peptide mit den experimentell erhobenen Daten verglichen werden können. Abschließend ist zudem zu bedenken, dass Informationen über labile PTMs leicht verlorengehen können und sehr kurze Peptide (< 5 AS) bei Verwendung einiger Methoden eventuell massenspektrometrisch nicht detektiert werden. Im Rahmen der sogenannten *Shotgun-Proteomics*, bei der der Fokus auf der gleichzeitigen Identifizierung möglichst vieler Proteine in einer Probe liegt, ist dies dennoch das Verfahren der Wahl.^[196]

Bei der *Top-down*-Methode werden ganze Proteine in die Gasphase gebracht und die Vorläuferionen anschließend in den meisten Fällen mittels ECD oder ETD fragmentiert.^[197] Auf diese Weise bleiben nicht nur sehr labile PTMs wie Phosphorylierungen erhalten, es ist theoretisch auch mit einer Analyse die gesamte Sequenz zugänglich. Dies ermöglicht zusätzlich die Identifikation unterschiedlicher Spleißvarianten innerhalb einer Proteinspezies.^[198]

2.3.3 Native Massenspektrometrie

Studien nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten Supramolekularer Strukturen, wie z. B. bei Viren, Protein-Protein-, Protein-DNA- oder Antigen-Antikörper-Komplexe erfordern den Erhalt der Selektivität und Spezifität wie unter nativen Bedingungen. Der Begriff der nativen Massenspektrometrie wurde durch die Gruppe um A. HECK geprägt und bezeichnet Methoden, die dazu geschaffen wurden diese Systeme in ihrer ursprünglichen Form, also unter Erhalt der Tertiär- und Quartärstruktur, massenspektrometrisch zu charakterisieren.^[199] Die Entwicklung der (nano-)ESI ermöglicht die Verwendung reiner Puffersysteme, sodass nicht nur sehr schonend ionisiert, sondern mittels des flüchtigen Ammoniumacetats nahezu physiologische Bedingungen geschaffen werden können.^[200]

2. EINLEITUNG

Mehrere Faktoren sind von entscheidender Bedeutung, um die nativen biomolekularen Strukturen massenspektrometrisch verlässlich detektieren zu können: Die gezielte Druckerhöhung in der ersten Vakuumkammer führt zu deutlich verbesserter Transmission großer Ionen in das Massenspektrometer, da diese durch Stöße mit Gasmolekülen gebremst werden (*collisional cooling*).^[201-202] Zudem müssen die Transfermultipole in ihrer Frequenz so modifiziert werden, dass sie für größere m/z -Werte durchlässig werden.^[203] Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem nach VAN DEN HEUVEL *et al.* modifizierten High-mass Q-ToF-MS gearbeitet (Abb. 2.13).^[204-205]

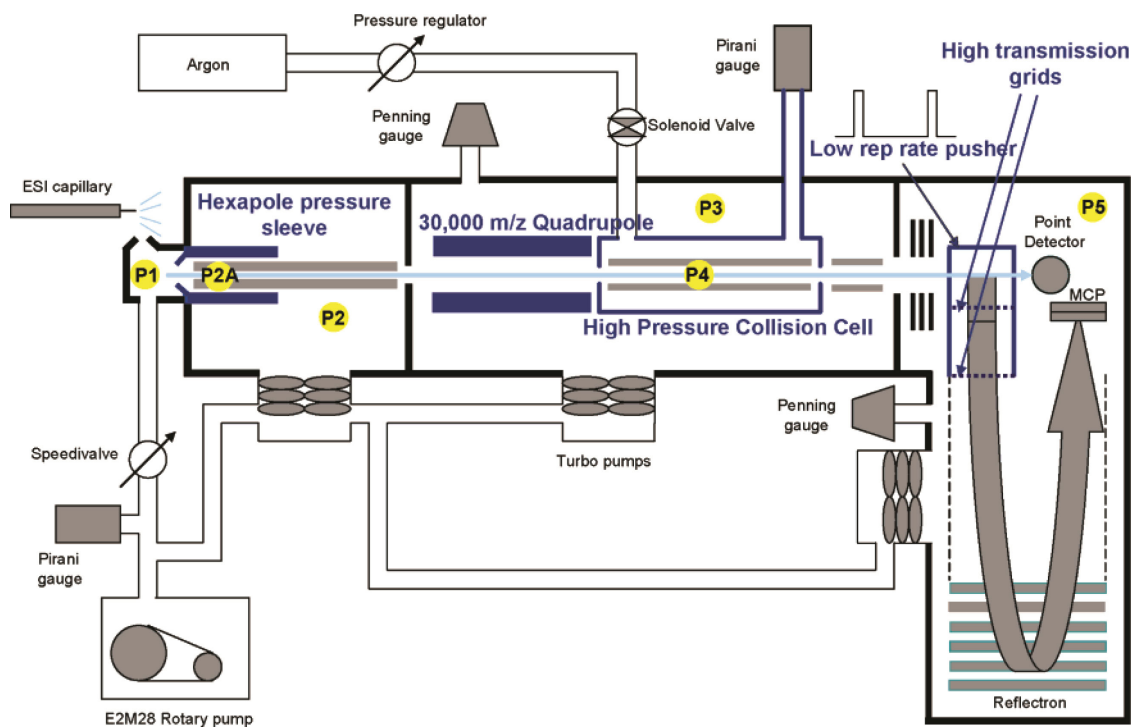


Abbildung 2.13: Aufbau eines für die Messung großer Ionen modifizierten Micromass High-mass Q-ToF-MS von Waters mit der Möglichkeit zu MS/MS-Experimenten mittels CID in einer Kollisionszelle.^[205]

Inzwischen sind auch Orbitrap-Geräte soweit modifiziert worden, dass sich damit komplexe native Biomolekülstrukturen vollständig und mit deutlich verbesserter Auflösung analysieren lassen.^[206] Mittels Gasphasen-MS/MS lassen sich oft gute Rückschlüsse auf die Anordnung nicht-kovalenter Strukturen in Lösung ziehen. Als Beispiel sei hier das humane Proteasom genannt, das aus insgesamt 28 Untereinheiten besteht. Entsprechend der angenommenen räumlichen Anordnung der verschiedenen Einheiten, wird mittels CID eine der strukturell außen liegenden Einheiten abgespalten.^[207] Innerhalb der letzten 10 Jahre hat sich die native MS auch mehr und mehr als gern genutzte Technik zur Charakterisierung von (therapeutischen) Antikörpern entwickelt. Abgesehen vom Vorteil des Erhalts der strukturellen Integrität, was bspw. Affinitätsstudien oder die Untersuchungen zur Antikörperaggregation ermöglicht,

2. EINLEITUNG

können mittels *Top-down*-Analytik zusätzlich Informationen über die Aminosäuresequenz gewonnen werden.^[208-209] Die Peakbreite für Antikörper unter klassischen Analysebindungen mittels High-mass Q-ToF-MS liegt bei 25 Da, sodass Deamidierungen oder Oxidationen nicht aufgelöst werden können. Durch moderne Instrumentierungen kann jedoch eine Massenauflösung von 10-100 ppm erreicht werden, was die direkte Charakterisierung der Glycanstrukturen ermöglicht, die sich für einen Großteil der Antikörper-Mikroheterogenität verantwortlich zeichnen.^[210]

Die massenspektrometrische Untersuchung von Antigen-Antikörper-Komplexen und deren stöchiometrischer Zusammensetzung wurde erstmals im Jahr 2001 von TITO *et al.* erfolgreich durchgeführt.^[211] Seither konnte nicht nur die Stöchiometrie verschiedener Komplexe mittels nativer MS erfolgreich ermittelt werden, es zeigte sich auch, dass in einer Kombination aus Proteolyse und MS/MS-Experimenten lineares Epitop-Mapping möglich ist.^[212] Mittels hochauflösender Tandem-MS konnten DYACHENKO *et al.* einwandfrei einen IgG-Hexamerkomplex mit insgesamt zwölf Antigenen im Massenbereich einiger MDa durch gezielte Dissoziation charakterisieren.^[213]

Neben der klassischen manuellen Auswertung können die erhaltenen Spektren auch automatisch mit Hilfe des MaxEnt-Algorithmus (Software *MassLynx* von Waters) dekonvolviert werden.^[214-215] Basierend auf den mehrfach geladenen Spezies wird unter Berücksichtigung der Signalintensitäten, dem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis sowie der jeweiligen Halbwertsbreite (*Full width at half maximum*, FWHM) das wahrscheinlichste dekonvolvierte *parent mass*-Spektrum des Moleküls im ungeladenen Zustand generiert. Unter der Annahme, dass die Desolvatisierung großer Moleküle auch bei hoher Kollisionsenergie (KE) nicht vollständig abläuft, haben MCKAY *et al.* ein alternatives Verfahren zur exakten Massenbestimmung entwickelt. Dazu gehen sie von einem linearen Zusammenhang zwischen den m/z -Werten der Peakmaxima und den Halbwertsbreiten entsprechender Peaks bei einer definierten Kollisionsenergie aus. Die Auftragung der Werte für steigende Kollisionsenergien ermöglicht die Berechnung eines theoretischen m/z -Werts für das vollständig desolvatisierte Analyt unter der Annahme, dass die Halbwertsbreite dann null beträgt.^[204]

2.4 Verwendung und Charakterisierung von Antikörpern

Aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften sind Antikörper inzwischen aus vielerlei Bereichen der medizinischen Forschung und Diagnostik, aber auch der chemischen und biochemischen Anwendung nicht mehr wegzudenken. Innerhalb der letzten 25 Jahre sind bereits über 30

2. EINLEITUNG

verschiedene Immunglobuline für die therapeutische Anwendung entwickelt, ausführlich getestet und zur Behandlung verschiedenster Krankheiten zugelassen worden.^[216-217] Die einzigartige Antigenspezifität der Antikörper zum einen eine direkte Adressierung der Zielstruktur. Zum anderen geht die Therapie aufgrund dieser Spezifität meist mit geringeren Nebenwirkungen einher als bei Behandlung mit klassischen Medikamenten. Als Beispiel sei hier die Behandlung maligner Karzinome mit Hilfe des humanisierten monoklonalen Antikörpers *Trastuzumab* in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika genannt. Der Antikörper bindet spezifisch auf den HER2/neu-Rezeptor, der üblicherweise auf Tumorzellen überexprimiert wird. Auf diese Weise werden die Krebszellen durch in Gang gesetzte ADCC oder Apoptose an der Proliferation gehindert.^[218-219] In Weiterentwicklung dieses Prinzips werden große Anstrengungen unternommen, um Arzneimittel mittels Antikörper direkt zu ihrem designierten Wirkungsort zu transportieren und dort gezielt freizusetzen. So wurde das für seine zytotoxische Wirkung bekannte Maytansinoid DM1 erfolgreich an *Trastuzumab* gekoppelt. Dieses sogenannte Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (*Antibody-drug conjugate*, ADC) verspricht einen erheblichen Zusatznutzen in der Therapie von Brustkrebs und gehört damit zu einem von drei ADCs weltweit, die überhaupt Marktreife erreicht haben.^[220-221] Ein weiterer wichtiger Anwendungsbereich für Antikörper liegt in der biochemischen Analytik von beispielsweise Toxinen, Rückständen in Lebensmitteln, aber auch größeren Biomolekülen wie Proteinen. Dabei kann mit der Immunoaffinitätschromatographie ein Verfahren zum Einsatz kommen, das die unkomplizierte und leistungsfähige Reinigung und Konzentration des gewünschten Analyten mit Hilfe einer Trennsäule, auf der der Antikörper immobilisiert wurde, ermöglicht.^[222-223] Mit Hilfe immunadsorptiver Verfahren wiederum können Zielanalyten schnell und einfach quantifiziert werden. Das Prinzip beruht darauf, dass nach der Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes gezielt eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion ausgelöst wird, die photometrisch detektiert werden kann. Man unterscheidet zwischen direktem und Sandwich-ELISA, sowie dem kompetitiven Immunassay (**Abb. 2.14**). Beim ELISA wird jeweils der Detektionsantikörper mit dem gewünschten Enzym, typischerweise Alkalischer Phosphatase oder Meerrettichperoxidase versehen, während beim kompetitiven Assay dasselbe Antigen als Referenz mit dem Enzym gekoppelt wurde. In diesem Fall ist die Signalintensität umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.^[224-225] In der Praxis wird beim ELISA anstelle des enzymmarkierten Detektionsantikörpers meist ein Sekundärantikörper verwendet, der entsprechend z. B. speziesspezifisch auf den Fc-Teil des Detektionsantikörpers reagiert. Auf diese Weise umgeht man die Markierung des Antigen-spezifischen AKs, die neben dem vermehrten Aufwand oftmals seine Bindungsspezifität

2. EINLEITUNG

negativ beeinflusst, und kann stattdessen auf kommerziell verfügbare Antikörper zurückgreifen.^[226]

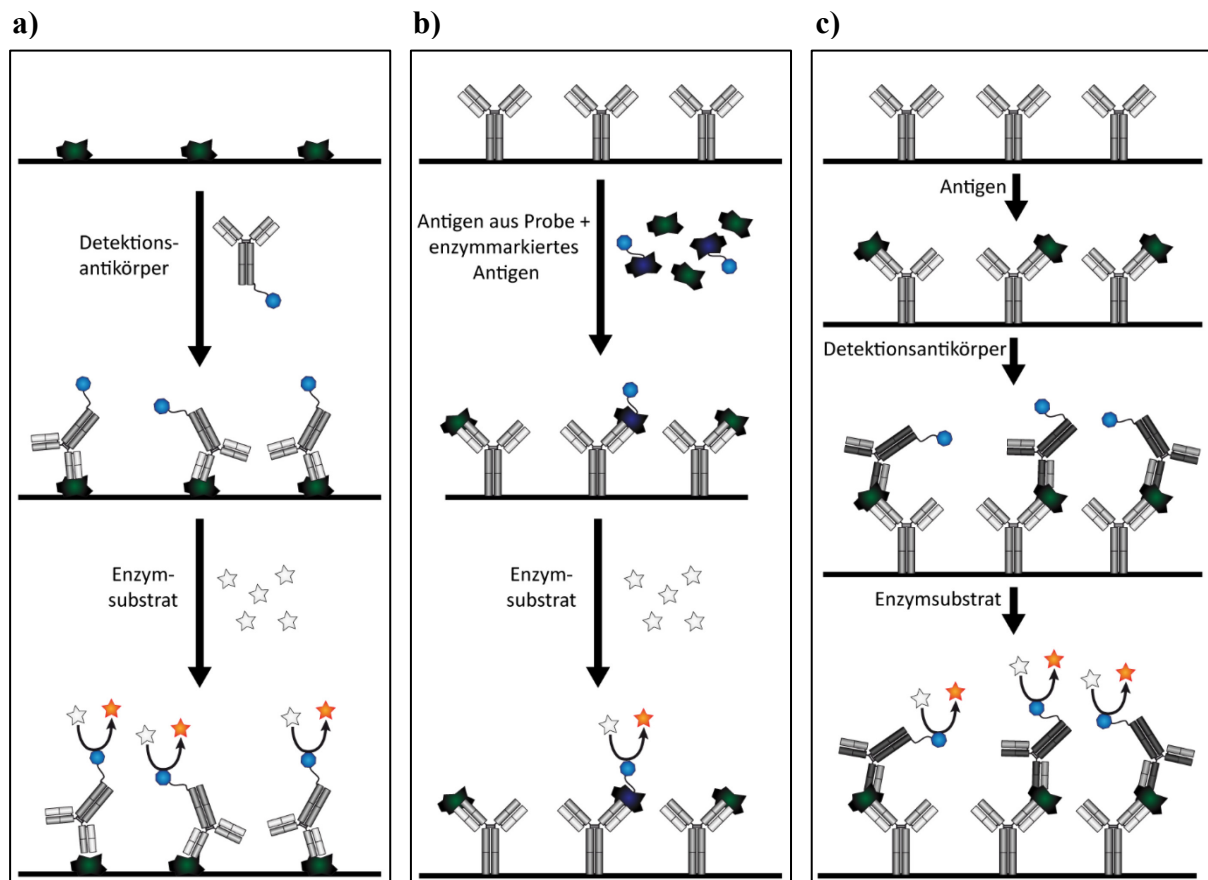


Abbildung 2.14: **a)** Direkter ELISA: Der enzymmarkierte Antikörper in Lösung bindet an das immobilisierte Antigen. Die gewünschte Farbreaktion wird durch katalytische Umsetzung des hinzugegebenen Substrats durch das Antikörper-gebundene Enzym ausgelöst. **b)** Kompetitiver Immunassay: Der gewünschte Analyt aus der Probe konkurriert mit dem gleichen, der Probe zugesetzten, enzymmarkierten Analyten um die Bindungsstelle am immobilisierten Antikörper. Nach Einstellung des Gleichgewichts wird das Enzymsubstrat hinzugegeben, dessen Umsetzung in einer Farbreaktion resultiert. **c)** Sandwich-ELISA: Es werden zwei Antikörper verwendet, die jeweils an unterschiedliche Epitope des Antigens binden. Nach Komplexierung des Analyten durch den immobilisierten AK wird der Detektionsantikörper hinzugegeben.

Für die sogenannte Immunhistochemie, die in der biochemischen und medizinischen Forschung besondere Relevanz besitzt, werden ebenfalls markierte Antikörper benötigt. Es werden häufig fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt, sodass mit Hilfe dieser Methode z. B. Proteine direkt in einem Gewebeschnitt angefärbt und photometrisch detektiert werden können. Eine häufige Anwendung findet sich im Bereich der Krebsdiagnostik, indem der Antikörper an sogenannte Tumormarker bindet und so eine Identifizierung und Lokalisation von krankem Gewebe auf Zellebene ermöglicht.^[227] Neben den Fluoreszenzfarbstoffen hat sich ebenfalls die Einführung eines Metalltags bewährt.^[228] Als besonders erfolgversprechend erwies sich dabei die Verwendung des Komplexbildners 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure

2. EINLEITUNG

(DOTA), in den dreiwertige Lanthanoidionen eingebracht wurden. Die Detektion des Antikörpers kann dann über das entsprechende Metallion mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) erfolgen. Auf Basis dieses Prinzips wurden entsprechend markierte Antikörper erfolgreich zur Detektion von Proteinen bei Western Blots und auch bei der Untersuchung von Gewebeproben mittels Laserablations-ICP-MS (LA-ICP-MS) eingesetzt.^[229-230] Ein immenser Vorteil dieser massenspektrometrischen Methode im Vergleich zur Fluoreszenz liegt in dem über mehrere Größenordnungen messbaren Bereich der Metallkonzentration, der Möglichkeit zur absoluten Quantifizierung durch einfache Kalibration mit Salzstandards und Multiplexing durch Einsatz verschiedener Metalle. Des Weiteren gibt es kaum Störungen des Signals wie bspw. Autofluoreszenz durch Matrixbestandteile der untersuchten Probe oder nachträglich eingebrachte (chemische) Verunreinigungen.

2.4.1 Markierung von Antikörpern

Allgemein steht man bei der Markierung von Antikörpern vor der Herausforderung, dass trotz der Modifikation die Funktionalität des Antikörpers für die spätere Anwendung erhalten bleiben muss. Daher müssen möglichst milde Bedingungen zur Einführung des Tags gewählt werden um die native Struktur des Antikörpers bzw. im Speziellen die antigenbindenden Regionen nicht zu zerstören. Die chemische Struktur des Antikörpers bietet verschiedene Möglichkeiten die gewünschte Modifikation, sei es ein Wirkstoff, ein Fluorophor oder ein Metallkomplex, einzubringen. Ein bevorzugter Angriffspunkt sind die freien Aminofunktionen, dementsprechend vor allem in der Sequenz enthaltenen Lysine aber auch endständige N-terminale Aminosäuren. Etabliert haben sich Reagenzien, die als reaktive Gruppe eine Isothiocyanat- oder eine N-Hydroxysuccinimid-Funktion tragen (**Abb. 2.15 a**).^[231-232]

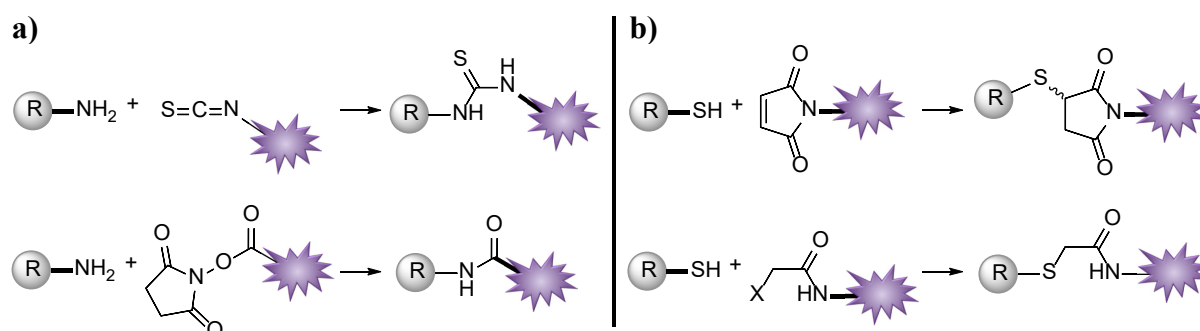


Abbildung 2.15: **a)** Reaktion einer freien Aminogruppe des Antikörpers mit der Isothiocyanat- bzw. der Succinimidfunktionalität der einzuführenden Modifikation. **b)** Reaktion einer freien Thiolgruppe des Antikörpers mit der Maleinimid- bzw. einer Halogenacetamidfunktionalität der einzuführenden Modifikation.

2. EINLEITUNG

Ein Vorteil, der gleichzeitig auch als Nachteil ausgelegt werden kann, liegt darin, dass im Antikörper ausreichend freie Aminofunktionen vorhanden sind und so potentiell ein relativ hoher Markierungsgrad erreicht werden kann. Allerdings kann zum einen nicht gezielt eine bestimmte Aminosäureposition, an welcher die Reaktion stattfinden soll, adressiert werden und zum anderen könnte eine Bindung an die N-terminalen Aminosäuren der CDRs der V_H- bzw. V_L-Region unter Umständen das Paratop beschädigen. Alternativ kann auch die hohe Reaktivität von Thiolen gegenüber Maleinimid- oder Halogenacetamidfunktionalitäten ausgenutzt werden (**Abb. 2.15 b**).^[233-234]

Die dafür notwendige partielle Reduktion der Disulfidbrücken des Antikörpers erfordert einige Optimierung, um eine vollständige Spaltung bzw. Denaturierung des Antikörpers zu vermeiden. So konnten WÄNTIG et al. zeigen, dass bei Verwendung von TCEP zwar sowohl freie LC- und HC-Fragmente entstanden, nach Markierung mit einem metallierten Maleinimid-DOTA-Komplex aber trotzdem genug Antikörper mit intakter Antigenbindungsstelle vorhanden waren, um sie in Western Blot-Experimenten einzusetzen.^[228]

Die Gruppe um QASBA entwickelte einen alternativen Ansatz, der auf der enzymatischen Einführung einer bioorthogonalen Funktionalität beruht, die dann wiederum gezielt zur selektiven Markierung des Antikörpers genutzt werden kann.^[235-236] Zu diesem Zweck wurde die β -1,4-Galactosyltransferase T1 (β -GalT1(Y289L)) so mutiert, dass bspw. mit einer Azid-Funktionalität ausgestattete Galactose (GalNAz) an das nicht-reduzierende Ende eines freien GlcNAc-Restes gebunden werden kann (**Abb. 2.16**). Anschließend kann via 1,3-dipolarer Cycloaddition entsprechend das gewünschte Molekül eingeführt werden.^[237]

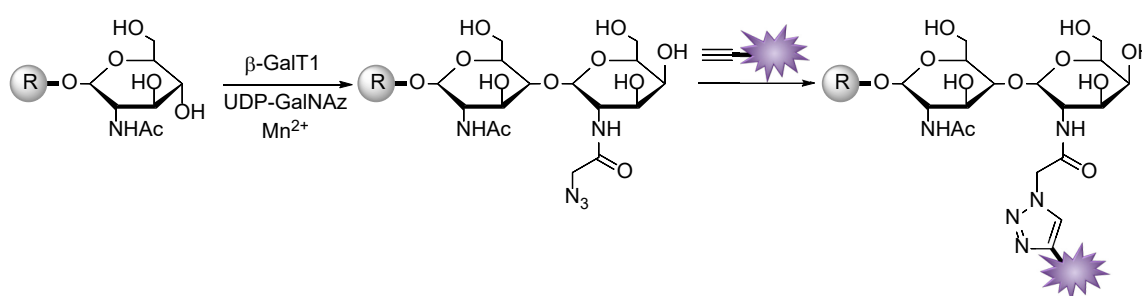


Abbildung 2.16: Enzymatische Einführung eines an Uridindiphosphat (UDP) gebundenen GalNAz-Restes mit Hilfe von β -GalT1 an einen GlcNAc-Rest unter Abspaltung von UDP. Ein mit einer Alkinfunktionalität ausgestattetes Molekül kann im nächsten Schritt via 1,3-dipolarer Cycloaddition gebunden werden.

Gegenüber den anderen Methoden nutzt diese Herangehensweise aus, dass enzymatische Reaktionen allgemein sehr spezifisch sind und unter nativen Bedingungen ablaufen. Wird bei der Cycloaddition statt eines endständigen ein gespanntes Alkin verwendet, kann auf Kupferkatalyse verzichtet werden, was den Einsatz der Reaktion in nativer Umgebung

2. EINLEITUNG

ermöglicht.^[238] Seit der Einführung des Begriffs der bioorthogonalen Markierung durch C. BERTOZZI sind zu diesem Zweck diverse Reagenzien auf Basis eines Cyclooctins, wie bspw. Dibenzocyclooctin (DIBO), synthetisiert und erfolgreich eingesetzt worden.^[239-240]

2.4.2 Sequenzbestimmung von Antikörpern

Zu den elementaren Bestandteilen einer vollständigen Antikörpercharakterisierung zählt auch die Bestimmung der primären Aminosäuresequenz. Gerade im Rahmen der aktuellen Forschung zur Generierung neuer monoklonaler Antikörper zu therapeutischen Zwecken hat sich gezeigt, dass bspw. die Kenntnis der an der Antigenbindung beteiligten Aminosäuren in den CDRs ein wichtiger Schritt für die gezielte Optimierung der gewünschten Spezifität sein kann. Schon minimale Mutationen in der Sequenz oder PTMs können erhebliche Änderungen der Funktionalität zur Folge haben.^[210, 241] So können Deamidierungen oder Oxidationen, die mitunter bei längerer Lagerung auftreten, durchaus signifikante Strukturänderungen verursachen.^[127] Für die Qualitätskontrolle von Antikörpern ist daher eine 100 %-ige Sequenzaufklärung unumgänglich. Diese kann entweder auf Basis der DNA oder direkt auf Proteinebene durchgeführt werden. Für erstere Methode werden die Antikörper-produzierenden Hybridomzellen benötigt. Üblicherweise wird hier zunächst die mRNA extrahiert, in cDNA übersetzt, mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert und anschließend klassisch nach Sanger oder mittels *Next-Generation-Sequencing* analysiert.^[242-243] Es gibt jedoch auch einige Probleme, die bei dieser Vorgehensweise auftreten können. So zeichnen sich Hybridomzellen durch eine gewisse genetische Instabilität aus, die als Konsequenz zu verschiedensten Mutationen in der Sequenz des gewünschten Antikörpers führen kann.^[157] Außerdem können bei der Produktion der benötigten cDNA sowohl durch entartete Primer als auch durch ungenau arbeitende DNA-Polymerasen im Rahmen der PCR Replikationsfehler auftreten.^[244]

Alternativ kann der Antikörper wie bei klassischen Proteomics-Studien enzymatisch verdaut, die entstandenen Peptide bspw. über Umkehrphasen-HPLC (*reversed phase*, RP) getrennt und mittels Tandem-MS analysiert werden (**Abb. 2.17**). In diesem Fall sind nicht nur Mutationen in der Primärsequenz sondern auch zahlreiche PTMs in einem Schritt zugänglich.^[245] Oftmals bietet es sich an, den Antikörper vor der Proteolyse zu reduzieren und gelelektrophoretisch in leichte und schwere Kette zu trennen, da dies zum einen die nachfolgende Analytik erleichtert und zudem Verunreinigungen der Probe leicht abzutrennen sind. Eine besondere Herausforderung stellt die Sequenzbestimmung der variablen Regionen eines unbekannten

2. EINLEITUNG

Antikörpers dar, da diese eine jeweils spezifische einzigartige AS-Reihenfolge besitzen und somit nicht per automatisierter Datenbanksuche zu identifizieren ist.^[246] In diesem Fall muss auf die *De Novo*-Peptidsequenzierung zurückgegriffen werden, bei der die Auswertung der Spektren ausschließlich anhand der Peptidmassen und Massendifferenzen zwischen den Signalen der Fragmente stattfindet. Da auch unbekannte Mutationen und Modifikationen auftreten können und die Massenunterschiede oftmals sehr gering sind, muss eine hohe Genauigkeit und Auflösung der aufgenommenen Spektren gewährleistet sein.

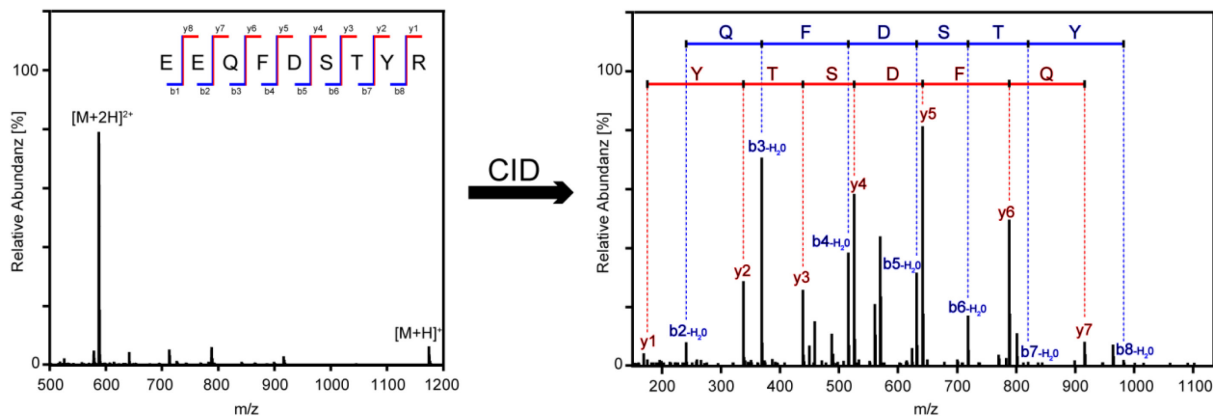


Abbildung 2.17: Massenspektrum des aus dem Übersichtscan isolierten einfach und zweifach positiv geladenen Vorläuferions des tryptischen Beispielpeptids EEQFDSTYR sowie das resultierende MS/MS-Spektrum mit b- und y-Ionen nach Fragmentierung mittels CID. Durch Massendifferenzen zwischen den einzelnen Signalen der unterschiedlichen Ionenserien lässt sich die Peptidsequenz ermitteln.

Üblicherweise wird ein Antikörper mit mehr als einem Enzym verdaut. Dies ist notwendig, da manche Peptide gar nicht massenspektrometrisch charakterisiert werden können und die identifizierten Peptide auch eine gewisse Überlappung aufweisen müssen, damit aus ihnen eine vollständige Primärsequenz erstellt werden kann. Neben Trypsin werden bspw. auch gerne GluC, AspN, LysC, LysN oder Chymotrypsin (CT) verwendet.^[247] Es ist allerdings zu beachten, dass es auch bei Enzymen mit hoher Spezifität zu Fehlschnitten kommen kann, also nicht entsprechend der definierten Aminosäuren gespalten bzw. Schnittstellen ausgelassen werden (*missed cleavages*). So konnten FANG *et al.* bei der Proteolyse verschiedener Proteine mittels Trypsin zahlreiche nicht- und semi-tryptische Peptide identifizieren.^[248] Diese lassen sich nicht allein durch Fragmentierung während des Ionisationsprozesses (*in source fragmentation*) erklären, sondern scheinen vor allem von den Bedingungen bei der Probenvorbereitung, wie pH-Wert, Inkubationszeit oder Kontamination des Enzyms abzuhängen. Diese Tatsache kann die Auswertung und Interpretation von Massenspektrum zusätzlich erschweren, vor allem, wenn wie bei der eindeutigen Charakterisierung eines unbekannten Proteins eine 100 %-ige Sequenzabdeckung notwendig ist.

Auswertung und Interpretation von Massenspektren

Wie bereits erwähnt wurden in der Vergangenheit einige Suchalgorithmen entwickelt, um die Auswertung von MS- und MS/MS-Daten zu erleichtern und zu beschleunigen. So gibt es zahlreiche Software-Programme, wie z. B. den Proteome Discoverer (Thermo Scientific), der verschiedene Algorithmen zur Peptididentifizierung verwenden kann.^[249-250] In diesem Fall sind jedoch nur Sequenzen zugänglich, die bereits in der Datenbank (DB) vorhanden sind, also bspw. die konstanten Teile einer AK-Spezies. Das Programm PEAKS (Bioinformatics Solutions) hingegen bietet sowohl einen Algorithmus zur Auswertung von *De Novo*-Daten, als auch die klassische Datenbank-Suche, die Bestimmung verschiedenster PTMs sowie die Möglichkeit Peptidmutationen durch Homologiesuche zu identifizieren.^[251] Zu Beginn werden zunächst die Parameter für die Analyse festgelegt, wie die maximale Massenabweichung bei der Spektrenauswertung, die Messbedingungen sowie optionale PTMs (z. B. Carbamidomethylierung von Cys). Für die *De Novo*-Peptide wird eine, anhand der MS/MS-Spektren bestimmte, relative lokale Sicherheit jeder einzelnen Aminosäure angegeben. Diese Peptide dienen als Basis um die DB-Suche hinsichtlich Genauigkeit und Geschwindigkeit zu optimieren. Durch *in silico*-Methoden werden aus einem Protein mögliche Peptide bzw. deren theoretische Spektren erzeugt, die wiederum mit den gemessenen verglichen werden (*peptide spectrum matching*). Die Sicherheit, dass ein Spektrum einem Peptid und dieses wiederum einem bestimmten Protein korrekt zugeordnet wurde, wird durch den -logP-Wert angegeben, der u.a. auf der Massenabweichung, der Güte der Fragmentationsserien und der Anzahl von *missed cleavages* beruht. Als Ergebnis wird die Sequenzabdeckung für ein Protein farblich unterlegt und die aus den MS/MS-Spektren identifizierten Peptide blau dargestellt, sodass sofortiger Zugriff auf ebendiese besteht, und gefundene PTMs durch Kürzel oberhalb der jeweiligen AS gekennzeichnet (**Abb. 2.18**).^[252-253] Anschließend können die Daten zusätzlich zu den bereits zu Beginn festgelegten PTMs auf weitere natürliche und artifizielle Modifikationen untersucht werden, die mittels klassischer Datenbanksuche nicht erfasst werden. Auf diese Weise wird die Sequenzabdeckung nochmals deutlich erhöht. Um immer wieder auftretende Fehler bei der Spektrenauswertung zu minimieren, die z. B. durch Polymorphismen oder Fehler in der Datenbank auftreten, wurde der *Spider*-Algorithmus entwickelt. Dieser vergleicht *De Novo*-Peptide mit hoher lokaler Sicherheit der Aminosäuren mit Peptiden aus der DB und konstruiert durch Abwandlungen neue Sequenzen. Auf diese Weise können homologe Mutationen bzw. Sequenzierungsfehler erkannt und eliminiert werden. Auch DB-unbekannten Sequenzen wie die eines nicht-charakterisierten Antikörpers können über mehrere Schritte aufgeklärt werden.^[254]

2. EINLEITUNG

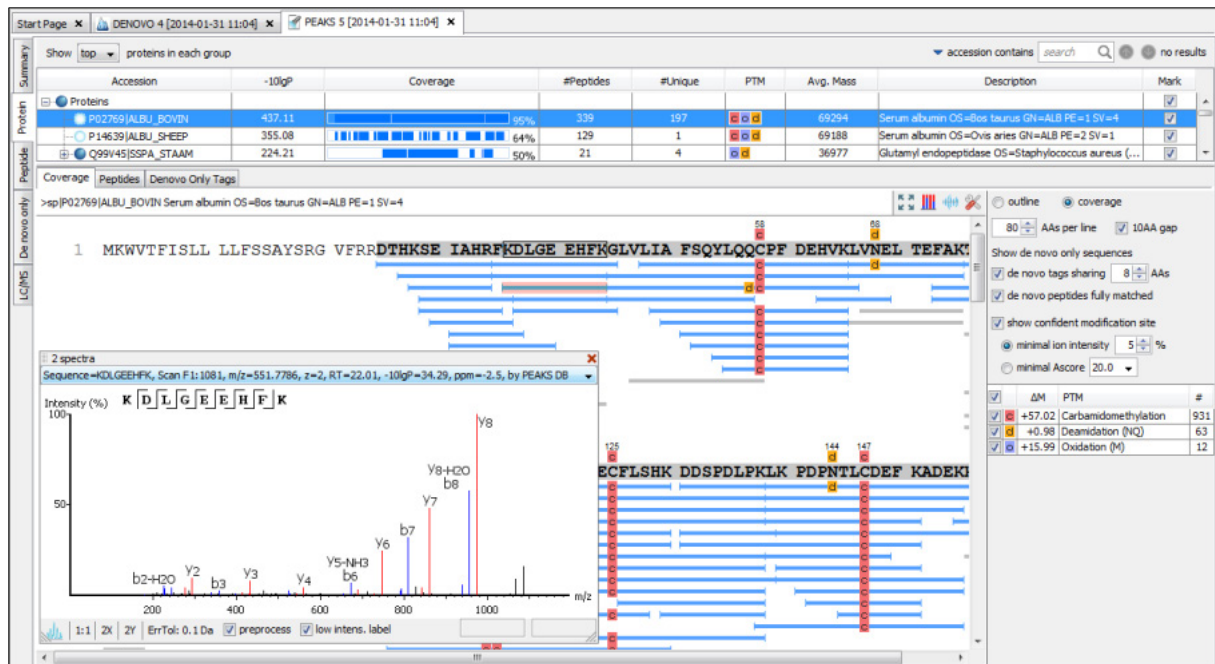


Abbildung 2.18: Typische Auswertung einer proteolytischen Sequenzierung, hier am Beispiel von BSA, das mittels dreier Proteasen gespalten und mit Hilfe von PEAKS analysiert worden ist. Gezeigt ist die Übersicht über die Sequenzabdeckung von BSA, die verschiedenen ermittelten Peptide sowie ein ausgewähltes MS/MS-Spektrum eines Peptids.

Die finalen Ergebnisse der Analyse, sprich die richtige Zuordnung der Spektren zu entsprechenden Peptiden, werden für jeden Schritt abschließend über die *False Discovery Rate* (FDR) bewertet.^[255] Dafür wird das bekannte klassische *Target-Decoy*-Verfahren, bei dem alle Spektren nach dem Vergleich mit der gewählten DB mit einer zufällig generierten Sequenz-DB der gleichen Größe verglichen werden, leicht abgewandelt.^[253] Statt eine neue *Decoy*-DB zu erstellen, werden *Target*- und *Decoy*-Sequenzen in einer DB kombiniert. Gefundene Peptide in der *Decoy*-DB sind als zufällige Treffer einzuordnen und geben daher eine gute Einsicht in die Qualität der Datenauswertung.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung des Antikörpers

Die orts aufgelöste Detektion von Cisplatin-DNA-Schäden in Geweben gehört zu den ursprünglichen Zwecken der Entwicklung des cPAK. Der Fokus liegt hierbei auf einer möglichen Minimierung von Nebenwirkungen und Resistenzen gegen das Antitumormittel. Da bis heute jedoch viele der dafür zugrundeliegenden Mechanismen nicht vollständig verstanden sind, ist es von enormer Bedeutung beteiligte molekulare Strukturen aufzuklären. Hier kann der cPAK einen entscheidenden Beitrag leisten. Eine Voraussetzung dafür ist jedoch, den Antikörper möglichst vollständig in Bezug auf seine Struktur, molekulare Zusammensetzung, Stabilität und vor allem auch Antigenspezifität zu charakterisieren. Dabei ist stets zu prüfen, ob der Antikörper reproduzierbare Ergebnisse liefern kann, d.h. eine übergeordnete Qualitätskontrolle ist von ganz besonderer Bedeutung. Den Grundstein für die genaue Charakterisierung bilden vergleichsweise schnelle und einfache Experimente wie Gelelektrophorese oder ELISA-Tests. Der weit größere Fokus in dieser Arbeit liegt jedoch in der massenspektrometrischen Untersuchung des Antikörpers. Die Mikroheterogenität innerhalb einer Generation desselben Antikörpers ist mittels MS gut zugänglich und lässt sich dank Hochauflösung unterschiedlichen PTMs zuordnen.

Die Reinheitsüberprüfung des in der Arbeitsgruppe von J. THOMALE produzierten Antikörpers erfolgte zunächst mittels reduzierender 2-dimensionaler SDS-PAGE (**Abb. 3.1**). Dabei werden die schwere und die leichte Kette zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und in zweiter Dimension aufgrund ihrer Masse aufgetrennt.

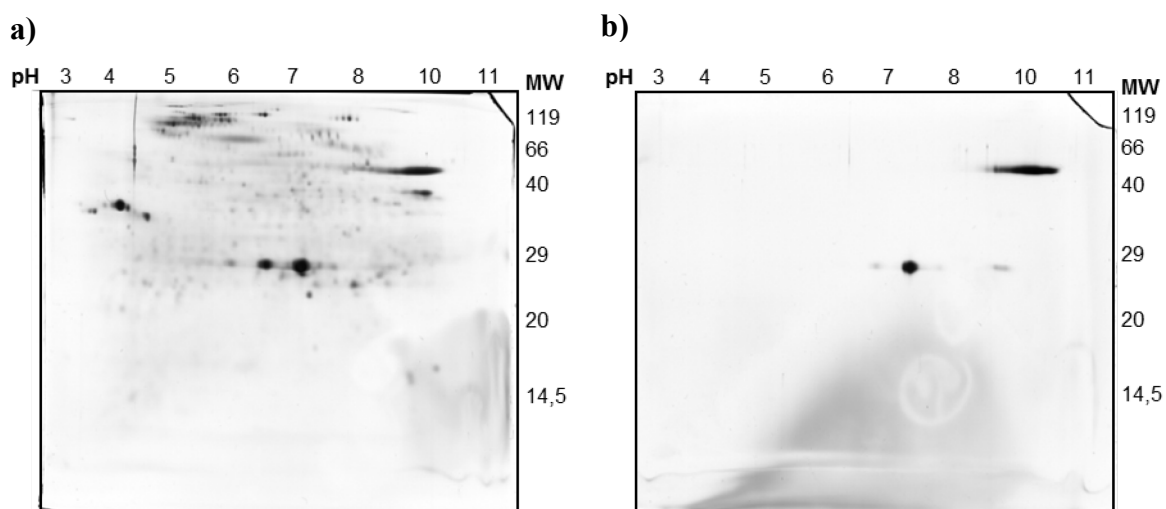


Abbildung 3.1: a) Reduzierendes 2D-SDS-Gel des einfach gereinigten cPAK und b) des mehrfach über Protein G-Säulen gereinigten cPAK. An dem Raster lassen sich der ungefähre isoelektrische Punkt und das apparente Molekulargewicht (MW) anhand eines Proteinstandards in kDa ablesen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Neben den erwarteten Spots für die schwere und leichte Kette ist eine Reihe von Verunreinigungen erkennbar, die offenbar bei der einfachen Reinigung nicht abgetrennt wurden. Diese sind auf die Art der AK-Herstellung zurückzuführen. So sind in dem verwendeten serumfreien Nährmedium zur Zellkultivierung verschiedenste Vitamine, Wachstumshormone und auch Proteine wie BSA enthalten.^[139] Nach wiederholter, mindestens dreimaliger, Affinitätschromatographie mittels Protein G-Säulen konnte ein deutlich verbesserter Reinheitsgrad erzielt werden (vgl. **Abb. 3.1 b**). Das apparente Molekulargewicht sowohl der leichten als auch der schweren Kette liegt im erwarteten Bereich von ca. 25 kDa bzw. 50 kDa. Die Bande der schweren Kette erstreckt sich über einen relativ breiten pI-Bereich von ca. 9 - 10,5. Dies spricht dafür, dass dieser Teil des Antikörpers eine erhebliche Mikroheterogenität aufweist, eventuell begründet in unterschiedlichen Fc-gebundenen Zuckerstrukturen. Der Spot der leichten Kette bei einem pI von 7,3 beinhaltet hingegen wahrscheinlich nur eine Spezies. Die vollständige Abspaltung der N-glycosidisch gebundenen Zuckerstrukturen konnte mit PNGase F erfolgreich durchgeführt werden (**Abb. 3.2**).

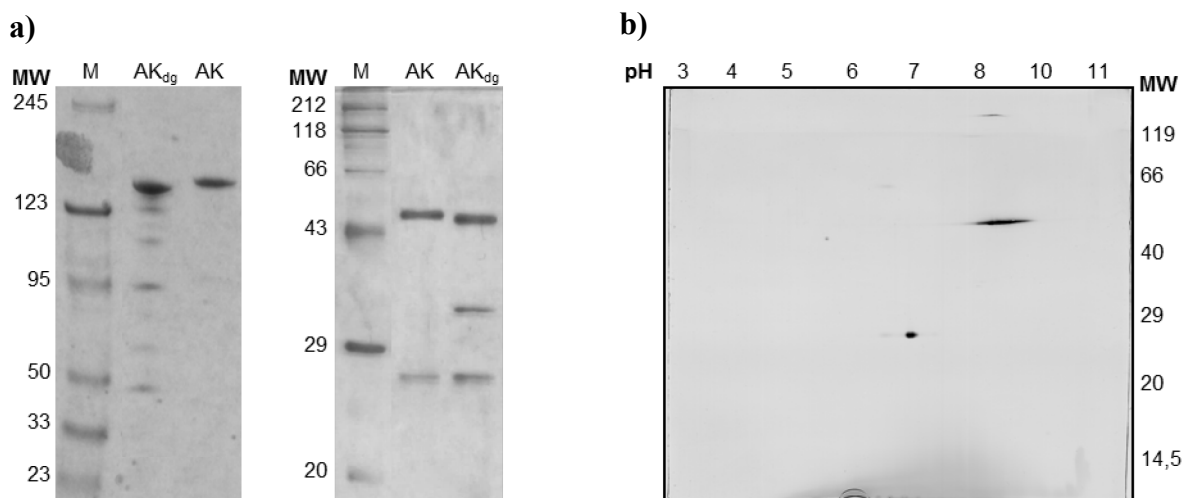


Abbildung 3.2: **a)** Nicht-reduzierendes 6 %-iges SDS-Gel (links) und reduzierendes 10 %-iges SDS-Gel (rechts) des glycosylierten cPAK (AK) und des mittels PNGase F deglycosylierten cPAK (AK_{dg}). **b)** 2D-SDS-Gel des deglycosylierten cPAK. Das ungefähre Molekulargewicht (MW) des Proteinstandards ist in kDa angegeben.

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen verschiebt sich die Antikörperbande im 1D-Gel leicht zu niedrigeren Massen. Zusätzlich treten artifizielle Banden auf. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein typisches Phänomen bei nicht-reduzierender SDS-PAGE von IgG. Im Laufe der Probenvorbereitung kann sowohl Disulfidbrücken-*Scrambling* als auch -Spaltung durch β -Eliminierung auftreten, in deren Folge der Antikörper in kleinere Teile zerfällt.^[256] Unter reduzierenden Bedingungen tritt im Vergleich nur bei der schweren Kette eine leichte Massenreduktion auf. Dies lässt vermuten, dass an der leichten Kette keine N-glycosidisch gebundenen Zucker vorhanden sind. Im 2D-Gel liegt die Bande für die schwere Kette bei einem

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

niedrigeren pI (ca. 8,0 – 9,5), da durch die Hydrolyse der N-glycosidischen Bindung zum Asparagin die freie Säure gebildet wird. Die Breite der Bande spricht dafür, dass noch weitere PTMs vorliegen, die eine AK-Mikroheterogenität verursachen. In Frage kommen dafür bspw. C-terminal gebundene Lysinreste oder auch Oxidationen der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin.^[111] Anders als in der Literatur beschrieben, hat die vollständige Deglycosylierung des Antikörpers offenbar einen nachweisbaren Effekt auf die Güte der Antigenbindung.^[257, 129] Dies ist im Rahmen eines ELISA-Tests festgestellt worden, bei dem platierte doppelsträngige Kalbsthymus-DNA als Antigen verwendet wurde. Hier kann eine um durchschnittlich 15 % reduzierte Aktivität des PNGase F behandelten cPAK gegenüber dem Kontrollantikörper nachgewiesen werden (**Abb. 3.3 a**). Da die Zuckerstrukturen an sich nicht in die Antigenbindung involviert sind, kann man vermuten, dass der Grund dafür in der Probenvorbereitung liegt, obwohl soweit möglich unter nativen Bedingungen ohne Zusatz von Detergenzien gearbeitet wurde.

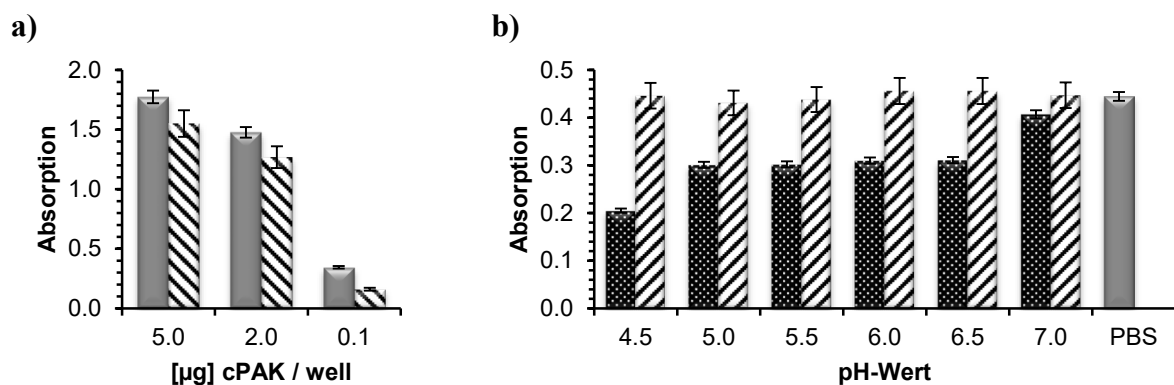


Abbildung 3.3: **a)** Aktivität des cPAK in verschiedenen Konzentrationen in PBS gegen platierte ds-DNA vor (grau) und nach (schwarz-weiß) Deglycosylierung. **b)** Aktivität des cPAK in Abhängigkeit des pH-Werts, bei dem AK und AG inkubiert werden. Bei den schwarzen Balken sind AK und AG direkt in NH_4OAc des gewünschten pH-Werts inkubiert worden, bei den schwarz-weiß gestreiften Balken erfolgte die AK-AG-Bindung in PBS, anschließend wurde 15 min in NH_4OAc nachinkubiert bevor der Sekundärantikörper hinzugegeben wurde. Die Inkubation in reinem PBS (grau) diente als Referenz.

Der pH-Wert weist einen deutlich entscheidenderen Einfluss auf die Bildung und Stabilität des Antigen-Antikörper-Komplexes auf.^[258] Zu genaueren Untersuchung wurden dafür zum einen der Komplex zunächst in PBS gebildet und anschließend in Ammoniumacetatlösung verschiedener pH-Werte (4,0 – 7,0) nachinkubiert, zum anderen wurde der Komplex direkt in der Ammoniumacetatlösung hergestellt. Im ELISA-Test zeigte sich, dass der Komplex, sofern in PBS gebildet, bis zu einem pH-Wert von 4,5 stabil bleibt (**Abb. 3.3 b**). Bei einem pH-Wert von 4,0 bestand nur noch 77 % der ursprünglichen Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass die Antigenbindungsstelle durch das Antigen gut abgeschirmt wird und somit keine Denaturierung

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

stattfinden kann. Im Vergleich dazu konnte in Ammoniumacetat bereits bei einem pH-Wert von 6,5 eine um 20 % verringerte Antigenbindung festgestellt werden. Bei einem pH-Wert von 4,5 bestand noch 50 % der ursprünglichen Aktivität, bei pH 4,0 nur noch gut 20 %. Als Gründe für diese Abnahme kommen eine beginnende Denaturierung und damit einhergehende Konformationsänderung der Paratope des Antikörpers in Frage. Laut VAN OSS basiert die Interaktion eines Antikörpers mit geladenen Antigenen nicht hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen, sondern eher auf Wasserstoffbrückenbindungen.^[259] Eine zunehmende Protonierung des Phosphatrückgrats der DNA bei niedrigerem pH-Wert könnte dieses Phänomen negativ beeinflussen.

Des Weiteren wurde noch überprüft inwiefern die gewählte Methode zur Reinigung und Aufkonzentration des Antikörpers mittels Zentrifugalfilter einen Einfluss auf dessen Bindungsaktivität hat. So wirken im Rahmen der Umpufferung durch die Zentrifugation Scherkräfte auf den Antikörper, die zur Aggregation und/oder Denaturierung führen können.^[260] Üblicherweise werden Antikörper mit Filtern einer Porengröße von 100 kDa bei 14.000 g gereinigt und zurückgewonnen. Mittels ELISA konnte festgestellt werden, dass bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von bis zu 18.000 g keine nachweisbare Abnahme der Antikörperaktivität zu erwarten ist.

3.1.1 Analytik des Antikörpers mittels nativer MS und MS/MS

Die erfolgreiche Analytik des Antikörpers mittels nativer MS erfordert sowohl die Optimierung einiger Geräteparameter wie auch der Wahl des Lösungsmittels. Die besten Ergebnisse lieferte die Verwendung von 200 mM Ammoniumacetatlösung, auf die der Antikörper in einer Konzentration von 1 – 2 mg/mL umgepuffert wurde. Zum Vergleich wurden auch Messungen in 0,1 % Ameisensäure bei einem pH-Wert von 2,7 durchgeführt. Aufgrund des Geräteaufbaus müssen Cone- und Extractor-Spannung individuell für jede Messung angepasst werden. Höhere Spannung führt zu verstärkter Ionisation und damit erhöhtem Eintrag von Ionen in das Massenspektrometer, gleichzeitig jedoch auch zu verstärkter *in-source*-Fragmentation.^[261] Für den cPAK wurde stets eine Cone-Spannung von 99 V und eine Extractor-Spannung von 100 V gewählt. Die Wahl der Kollisionsenergie besitzt ebenfalls entscheidenden Einfluss auf die Güte der Massenspektren (**Abb. 3.4 a**). Mit steigender Kollisionsenergie wird der Antikörper zunehmend desolvatisiert, sodass sich die Signale zu niedrigeren *m/z*-Werten verschieben und gleichzeitig die Halbwertsbreite (*full width at half maximum*, FWHM) abnimmt. Ab einer Kollisionsenergie von 70 eV sind die Signale basisliniengetreunt. Die schärfsten Signale

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

(Ladung $21^+ - 28^+$) erhält man bei einer Kollisionsenergie von 100 eV. Hier liegt die Halbwertsbreite bei ungefähr 30 Da. Höhere Energien führen ausschließlich zu vermehrter Fragmentation unter Abnahme der absoluten Signalintensität des freien Antikörpers. In **Abb. 3.4 b** ist der Einfluss des pH-Werts dargestellt. Bei einem pH-Wert von 2,7 liegt der Antikörper sehr hoch geladen (Ladung $> 50^+$) in vielen verschiedenen Ladungszuständen vor. Die entsprechend notwendige Verteilung der Ladungen über das Molekül erfolgt unter Auffaltung der nativen Proteinstruktur. Die Zuordnung der Signale und damit die Auswertung der Massenspektren erweist sich in diesem Fall als schwierig, zudem kann es unter aziden Bedingungen vermehrt zur Aggregation des Antikörpers kommen.^[262]

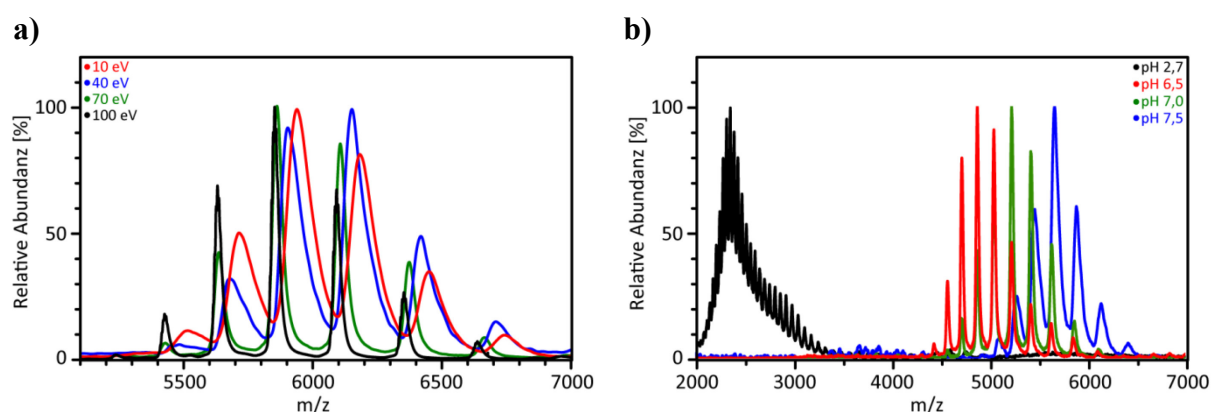
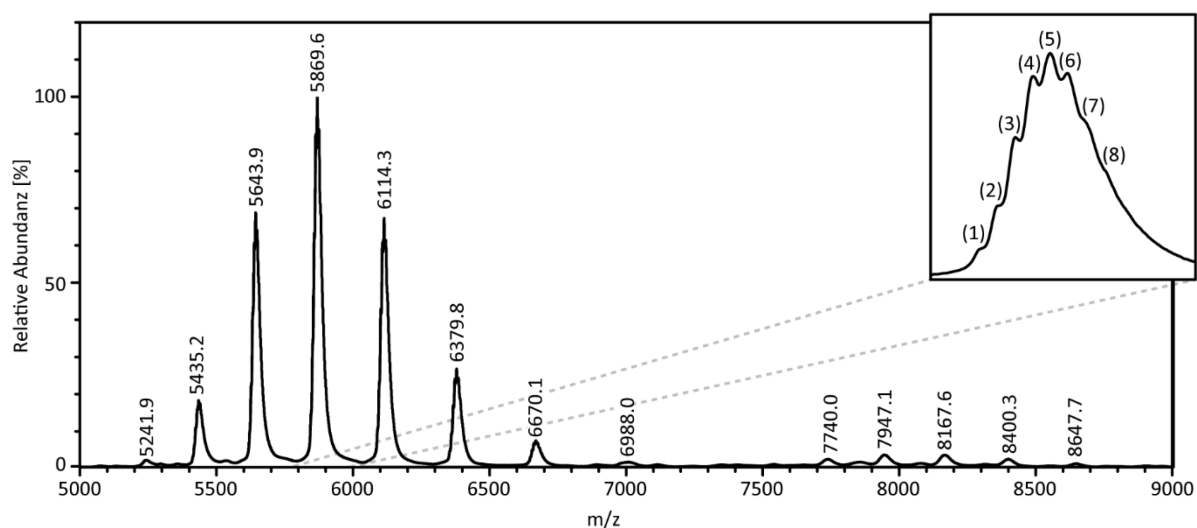


Abbildung 3.4: Vergleich von nano-ESI Q-ToF-Massenspektren des cPAK in einer Konzentration von 1 mg/mL bei **a)** zunehmender KE (rot: 10 eV, blau: 40 eV, grün: 70 eV, schwarz: 100 eV) und neutralem pH-Wert in 200 mM NH_4OAc und **b)** unterschiedlichen pH-Werten der Analyselösung (schwarz: 2,7; rot: 6,5; grün: 7,0; blau: 7,5) und einer KE von 100 eV.

Nahe des Neutralpunkts zeigen die Spektren eine ähnliche Signalverteilung, wobei sich die Ladungsserie bei niedrigerem pH-Wert zu höheren Ladungen verschiebt. Bezüglich der Auflösung, der Halbwertsbreite und der absoluten Intensität der Signale besteht zwischen pH 6,5 und pH 7,0 kein signifikanter Unterschied. Um soweit möglich native Bedingungen – auch für die spätere Messung der AG-AK-Komplexe – zu simulieren, wurde stets ein pH-Wert von 7,0 gewählt. Bei einer Kollisionsenergie von 100 eV sind sowohl acht verschiedene Ladungszustände des Antikörpers ($21^+ - 28^+$) als auch Signale für das Dimer ($34^+ - 38^+$) erkennbar (**Abb. 3.5**). Bei genauerer Betrachtung wird deutlich, dass unter den einzelnen Ladungszuständen unterschiedliche Feinstrukturen erkennbar sind. Die Ladungszustände des Antikörpers bilden eine Normalverteilung. Das jeweilige Molekulargewicht sowie die zugehörige Standardabweichung der acht identifizierten Antikörperstrukturen wurde manuell bestimmt. Die häufigste Spezies besitzt eine Masse von $146.719,2 (\pm 3,2)$ Da. Damit liegt die Masse um ca. 2,2 kDa höher als die aus der Aminosäuresequenz bestimmte theoretische Masse.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Diese Massendifferenz dürfte auf verschiedene PTMs zurückzuführen sein, besonders auf die im Fc-Bereich des Antikörpers gebundenen Zucker. Die Massenunterschiede zwischen den einzelnen Spezies passen, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, sehr gut zu möglichen unterschiedlichen Glycosylierungsmustern des Antikörpers. So entspricht die Differenz von 162 Da, die insgesamt vier mal auftritt, einer Hexose und damit vermutlich Galactose.



	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
MW [Da]	146.113,9 ($\pm 4,2$)	146.273,8 ($\pm 4,0$)	146.432,1 ($\pm 5,1$)	146.575,3 ($\pm 3,7$)	146.719,2 ($\pm 3,2$)	146.867,6 ($\pm 5,7$)	147.027,8 ($\pm 5,9$)	147.189,7 ($\pm 6,8$)
Δ MW [Da]		160,0 ($\pm 3,1$)	158,3 ($\pm 3,9$)	143,2 ($\pm 3,5$)	144,0 ($\pm 1,6$)	148,4 ($\pm 4,7$)	160,1 ($\pm 3,2$)	162,0 ($\pm 3,7$)

Abbildung 3.5: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des cPAK ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$) bei einer KE von 100 eV mit Vergrößerung des 25-fach geladenen Signals ($m/z = 5800 - 5950$) sowie manuell kalkulierte Molekulargewichte der acht identifizierten Antikörperspezies und die jeweilige Massendifferenz zwischen den einzelnen Feinstrukturen.

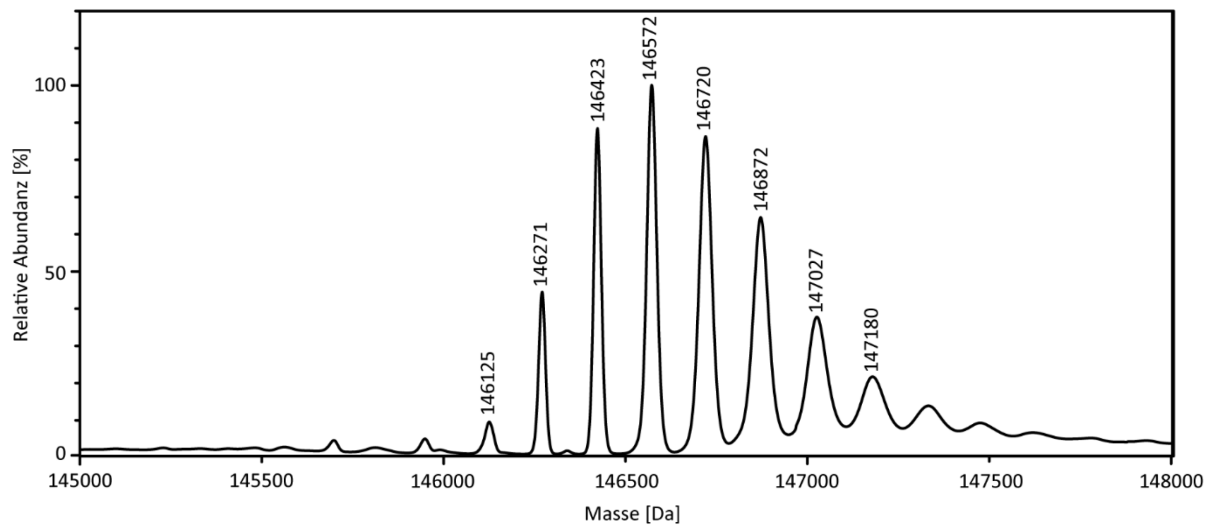
Des weiteren wurden Massenunterschiede von ca. 146 Da festgestellt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der Antikörper nicht symmetrisch glycosyliert sein muss, könnten diese Unterschiede einem unterschiedlichen Grad an Kernfucosylierungen zugeschrieben werden. Daraus ergeben sich für den glycosylierten Antikörper zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten: Es können sowohl unfucosylierte als auch fucosylierte Zuckerstrukturen mit keinem, einem oder zwei gebundenen Galactoseresten sowie zusätzlichen *bisecting* GlcNAc auftreten.^[111, 129] Eine terminale Modifikation mit Sialinsäure ist selbstverständlich ebenfalls möglich, die Detektion mittels der hier gewählten Methode ist allerdings sehr unwahrscheinlich. Um auszuschließen, dass sich unter den breiten Signalen nicht weitere PTMs verbergen, würde eine höhere Auflösung benötigt, die jedoch mittels des High-Mass Q-ToF-Massenspektrometers nicht erreicht werden kann. Hinzu kommt, dass eventuell auch zu hohe Massen für den

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

gesamten Antikörper gefunden werden, sofern keine vollständige Desolvatisierung der Ionen stattgefunden hat. Dies ist bei nativer MS nicht unwahrscheinlich, da anders als bei denaturierten Proteinen mitunter Lösungsmittelmoleküle innerhalb der komplexen dreidimensionalen Struktur eingelagert sein können.^[263] Für das Antikörperdimer (Ladungszustand 34+ – 38+) lässt sich nur ein mittleres Molekulargewicht von 294.010,0 (\pm 37,3) Da ermitteln, Feinstrukturen sind hier nicht auflösbar. Die Oligomerisierung von Antikörpern in wässrigen Lösungen ist ein bekanntes Phänomen. Die Bildung nicht-kovalenter Komplexe ist unter anderem auf Konzentrationseffekte zurückzuführen.^[264] Die schonende Ionisation und Detektion mittels nano-ESI High-Mass Q-ToF-MS bietet die Möglichkeit zum Nachweis dieser Oligomere, die aufgrund der Reversibilität der Reaktion ohne zusätzliche Methoden (z. B. kovalentes *Crosslinking* der AKs) sonst erschwert ist.^[265] In diesem Fall ist die Dimerbildung wahrscheinlich durch die Probenvorbereitung bedingt. Durch den notwendigen Schritt der Umpufferung auf Ammoniumacetatlösung wird der Antikörper zwischenzeitlich sehr stark aufkonzentriert, was die Dimerisierung begünstigen kann.

Nach der Methode von MC KAY *et al.* besteht die Möglichkeit die Masse unvollständig desolvatisierter großer Moleküle über den linearen Zusammenhang zwischen Halbwertsbreite und m/z-Wert bei verschiedenen Kollisionsenergien zu bestimmen.^[204] Dies bietet sich hier jedoch nicht an, da zum einen die Feinstrukturen erst ab einer Kollisionsenergie von 100 eV erkennbar werden und zum anderen die theoretische Halbwertsbreite der Signale niemals null betragen kann. Für Antikörper liegt diese üblicherweise je nach Grad der Desolvatisierung im Bereich von 25 Da. Für die einzelnen überlagerten Feinstruktursignale des cPAK-Monomers kann die Halbwertsbreite bei 100 eV auf ungefähr 6 kDa abgeschätzt werden. Auf dieser Basis lässt sich mit Hilfe des MaxEnt-Algorithmus (Software MassLynx 4.0, MaxEnt1) das Spektrum dekonvolvieren.^[214] Man erhält so ein artifizielles Spektrum der ungeladenen Spezies (**Abb. 3.6**). Die errechneten Molekulargewichte liegen erwartungsgemäß in demselben Bereich wie die manuell bestimmten, jedoch wird kein Fehler bzw. keine Standardabweichung angegeben. Das abundanteste Signal gehört zu einer Spezies mit der Masse 146.572 Da. Zudem kann man erkennen, dass neben den acht gut identifizierbaren Feinstrukturen wahrscheinlich noch weitere Spezies mit höherer Masse in der Probe enthalten sind. Aufgrund der mangelnden Auflösung können diese jedoch nicht mit ausreichender Sicherheit angegeben werden. Die Massendifferenzen zwischen den Feinstrukturen liegen hier ebenfalls bei durchschnittlich 150 Da was auf verschiedenste PTMs hindeutet. Das auf Basis der ungeladenen Spezies generierte theoretische Spektrum stimmt von der Ladungsverteilung, der Intensität der Signale und m/z-Verschiebungen sehr gut mit dem experimentellen überein (nicht gezeigt).

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION



MW [Da]	146.125	146.271	146.423	146.572	146.720	146.872	147.027	147.180
Δ MW [Da]		146	152	149	148	152	155	153

Abbildung 3.6: Mittels MaxEnt-Algorithmus generiertes dekonvolviertes Massenspektrum des cPAK. (Iterationsbedingungen: FWHM = 6,0 Da, Auflösung = 1 Da, Massenbereich = 140 – 150 kDa, 27 Iteration bis zur Konvergenz. Die Software gibt keine Standardabweichung an.)

Um die Komplexität der Massenspektren zu reduzieren, wurde der Antikörper unter nativen Bedingungen in PBS-Puffer deglycosyliert und sowohl gelelektrophoretisch als auch massenspektrometrisch analysiert. Zu diesem Zweck kamen zwei Enzyme zum Einsatz. Bei der Behandlung mit PNGase F erfolgt die Abspaltung der vollständigen Glycanstruktur unter Hydrolyse des Asparagins zu Asparaginsäure. Im Gegensatz dazu schneidet Endo S die Zuckerstruktur innerhalb des Chitobiosekerns, sodass je Kette ein GlcNAc- bzw. ein fucosylierter GlcNAc-Rest am Antikörper gebunden bleiben (**Abb. 3.7 a**). Anhand eines reduzierenden Gels lässt sich durch Vergleich mit dem nativen cPAK auf einfache und schnelle Weise abschätzen, ob die Zuckerabspaltung erfolgreich war (**Abb. 3.7 b**). Statt der klassischen Glycin-SDS-PAGE ist die Tricin-SDS-PAGE angewendet worden, da hier eine deutlich bessere Auflösung im Massenbereich von 50 kDa erzielt werden konnte. Auf diese Weise war es möglich, glycosylierte, deglycosylierte und teildeglycosylierte Strukturen trotz sehr geringer Massendifferenzen eindeutig aufzulösen und zu unterscheiden. So sieht man eindeutig, dass die Bande der leichten Kette in allen Fällen unverändert bei ca. 25 kDa verbleibt. Im Fall der Behandlung mit PNGase F verschiebt sich die Bande der schweren Kette leicht zu niedrigeren Massen. Man kann davon ausgehen, dass hier ein vollständige Zuckerabspaltung stattgefunden hat. Die zusätzliche Bande im Gel bei ca. 33 kDa ist der PNGase F zuzuordnen, die in relativ hoher Konzentration eingesetzt wurde. Bei Endo S hingegen finden sich zwei Banden bei ca.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

50 kDa, eine auf Höhe des glycosylierten und eine auf Höhe der PNGase F-behandelten schweren Kette. Demnach kann mittels Endo S scheinbar keine quantitative Deglycosylierung erzielt werden.

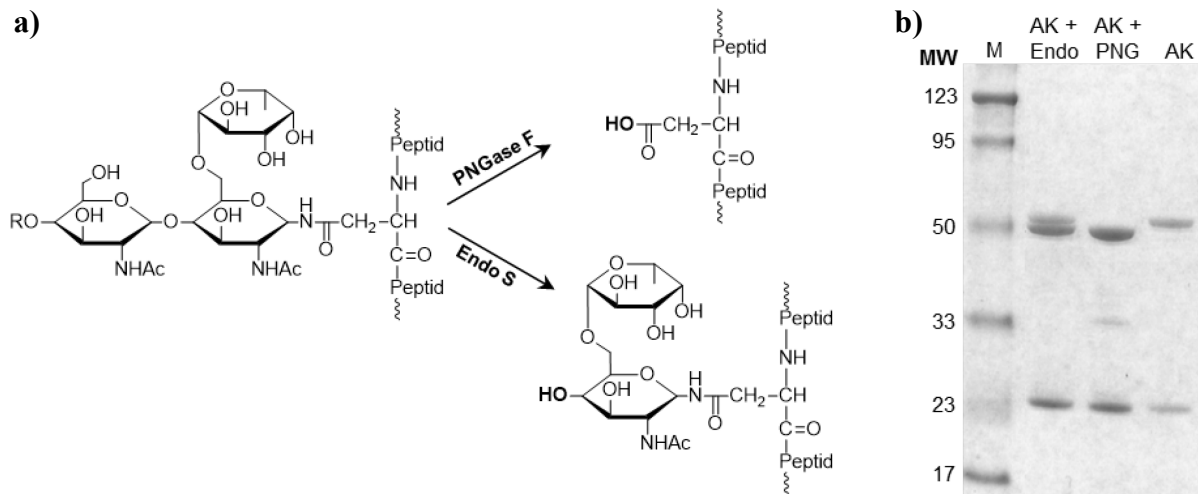


Abbildung 3.7: **a)** Spaltung der N-glycosidisch am Asparagin gebundenen Zuckerstrukturen mittels der Enzyme PNGase F bzw. Endo S. **b)** Reduzierendes 15 %-iges Tricine-SDS Gel des mit PNGase F bzw. Endo S deglycosylierten Antikörpers. Zum Vergleich wurde der unbehandelte cPAK aufgetragen.

Zur genaueren Untersuchung wird zunächst das Massenspektrum des mit PNGase F deglycosylierten cPAK betrachtet und mit dem Spektrum des nativen unbehandelten Antikörpers verglichen (**Abb. 3.8**).

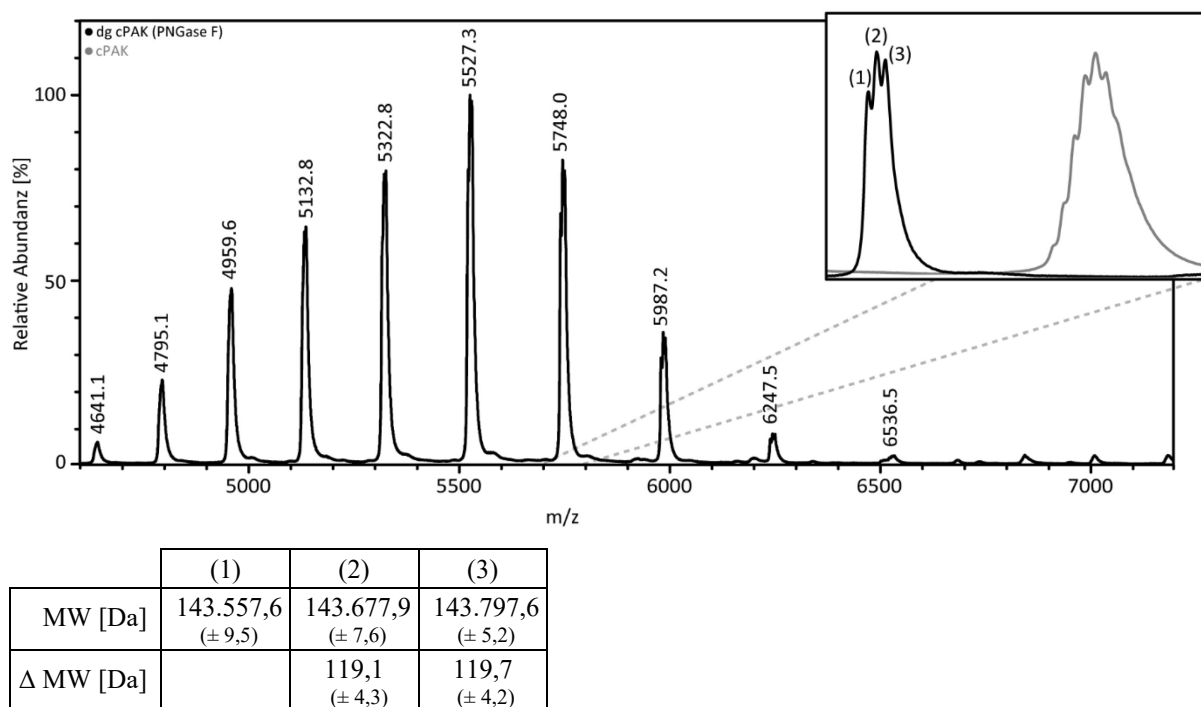
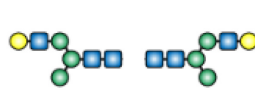


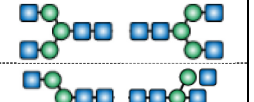


Abbildung 3.8: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des mittels PNGase F deglycosylierten cPAK ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$) bei einer KE von 100 eV mit Vergrößerung des 25-fach geladene Signals (schwarz) sowie zum Vergleich das 25-fach geladene Signal des glycosylierten cPAK (grau).

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Antikörper wird in insgesamt zehn Ladungszuständen (22+ – 31+) leicht höher geladen als der vollständig glycosylierten detektiert. In der Vergrößerung des 25-fach geladenen Signals ist eindeutig zu erkennen, dass die Mikroheterogenität stark abgenommen hat und nur noch insgesamt drei Feinstrukturen eindeutig identifiziert werden können. Die Massendifferenz zwischen den Signalen liegt entsprechend bei je ca. 119 Da. Zusätzlich dazu nimmt die abgeschätzte Halbwertsbreite der Signale leicht ab ($\text{FWHM} \approx 5,5 \text{ Da}$ für ein überlagertes Signal). Das manuell berechnete Molekulargewicht der leichtesten Spezies liegt bei $143.557,6 (\pm 9,5) \text{ Da}$. Im Vergleich mit der theoretische Masse auf Basis der ALDEVRON-Sequenz liegt sie damit über 900 Da niedriger als erwartet. Als Erklärung kommen hierzu prinzipiell nur zwei Möglichkeiten in Frage, zum einen, dass der Antikörper eventuell bereits teilfragmentiert ist oder aber ein Fehler in der Sequenz vorliegt. Dies lässt sich abschließend nur durch die Sequenzierung des Antikörpers auf Proteinebene klären. Um eine Aussage über das mögliche Glycosylierungsmuster zu treffen, wird stattdessen das ebenfalls mittels nativer MS bestimmte Molekulargewicht des glycosylierten cPAK zu Grunde gelegt. Es wurden exakt dieselben Bedingungen bei der massenspektrometrischen Analytik verwendet, sodass man vermuten kann, dass die zwischen den verschiedenen AK-Spezies bestehende Massendifferenz von $2.574,0 - 2.631,1 \text{ Da}$ ausschließlich durch die Glycanstrukturen verursacht wird. Da die beiden schweren Ketten des Antikörpers nicht zwangsläufig die gleichen Oligosaccharide tragen, ist eine unsymmetrische Glycosylierung durchaus möglich. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung sind die in **Tab. 3.1** dargestellten Kombinationen von Oligosaccharidstrukturen für die leichteste glycosylierte Antikörperspezies vorstellbar.

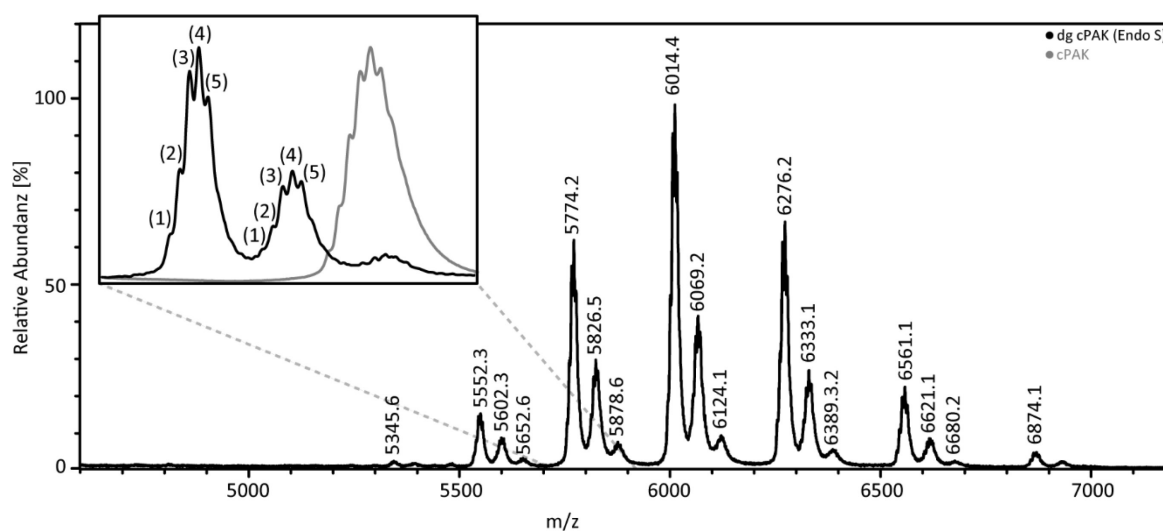
Tabelle 3.1: Molekulargewichte und Strukturen verschiedener Kombinationen C_H2-gebundener Glycanstrukturen.

	G1(-gn) * G1(-gn)	G0(-gn) * G0F G0 * G0F(-gn)	G0(-gn) * G1 G0 * G1(-gn)	G0 * G0 G0(-gn) * G0gn
MW _{av} [Da]	2.552,3	2.577,4	2.593,4	2.634,4
Strukturen				

Die nachweislich noch vorhandene Mikroheterogenität des Antikörpers muss also durch weitere PTMs verursacht werden. In Frage käme beispielsweise eine Cysteinylierung, die exakt zu einer Massenerhöhung von 119 Da führt.^[114] Hierbei handelt es sich um eine recht seltene Modifikation, die bei der Analytik des nativen Antikörpers durch wesentlich abundantere PTMs wie Glycosylierungen maskiert wird. Im Rahmen der allgemein üblichen klassischen Sequenzierung mittels Proteolyse und anschließender Analytik mittels Tandem-MS ist diese Modifikation auch an deglycosylierten Peptiden schwer nachweisbar, da nach üblicher

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Vorgehensweise zunächst alle Cysteinreste reduziert und alkyliert werden. Bei der Analytik mittels nativer MS entfällt diese Problematik. Alternativ könnten die zwei zusätzlichen diskreten Antikörperspezies auch ein Resultat von Kombinationen anderer Aminosäuremodifikationen wie bspw. Phosphorylierungen, Oxidation oder Carboxylierungen sein. Diese PTMs sollten sich wiederum gut mittels klassischer Tandem-MS-basierter Sequenzierungsmethoden verifizieren lassen. Bezüglich des in der Literatur postulierten zunehmenden Aggregationsverhaltens des Antikörpers nach Deglycosylierung kann anhand des Massenspektrums keine eindeutige Aussage getroffen werden. Antikörperdimere sind sowohl beim glycosylierten als auch beim deglycosylierten Antikörper nachweisbar und liegen bei ca. 5 % der Intensität des intensivsten Antikörpersignals. Dies kann also durchaus auf einen einfachen Konzentrationseffekt, der bei der Ionisation mittels ESI nicht unwahrscheinlich ist, zurückzuführen sein.^[266-267] Wie bereits aufgrund der gelelektrophoretischen Ergebnisse vermutet, lässt sich die unvollständige Deglycosylierung mittels Endo S auch massenspektrometrisch bestätigen (**Abb. 3.9**).



	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
MW _{AK-I} [Da]	143.914,1 (± 4,7)	144.058,2 (± 3,8)	144.200,7 (± 2,0)	144.328,6 (± 2,3)	144.456,4 (± 2,3)
Δ MW _{AK-I} [Da]		144,1 (± 3,6)	142,6 (± 3,6)	127,9 (± 2,3)	128,0 (± 3,1)
MW _{AK-II} [Da]	145.369,8 (± 3,2)	145.512,8 (± 6,0)	145.638,3 (± 2,5)	145.762,4 (± 6,1)	145.922,3 (± 8,5)
Δ MW _{AK-II} [Da]		142,9 (± 6,5)	-125,5 (± 7,5)	124,2 (± 6,4)	159,8 (± 9,1)
MW _{AK-III} [Da]	146.650,8 (± 18,0)	146.800,3 (± 13,8)	146.942,1 (± 7,8)	147.081,8 (± 10,9)	
Δ MW _{AK-III} [Da]		154,1 (± 9,4)	141,8 (± 10,4)	139,7 (± 15,7)	

Abbildung 3.9: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des mittels Endo S deglycosylierten cPAK ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$) bei einer KE von 100 eV mit Vergrößerung des 25-fach geladene Signals (schwarz) sowie zum Vergleich des 25-fach geladene Signal des glycosylierten cPAK (grau).

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auf den ersten Blick ist erkennbar, dass in der analysierten Lösung sogar drei verschiedene Antikörperspezies vorliegen, die wiederum eine Vielzahl an unterschiedlichen Feinstrukturen aufweisen. Bei einem Vergleich des Signals mit dem des nativen cPAK ist zu erkennen, dass es sich bei der dritten, am wenigsten abundanten Ladungsserie um den glycosylierten Antikörper (AK-III) handelt. Die anderen beiden Spezies dürften dementsprechend einer Teil- bzw. vollständigen Deglycosylierung zuzuordnen sein. Legt man die relative Intensität der im Massenspektrum zu Grunde, so sind nur etwa 5 % des Antikörpers nicht von Endo S verdaut worden, bei ca. 30 % wurde der Zuckerrest nur an je einer schweren Kette abgespalten (AK-II), während bei rund 66 % des cPAK wie gewünscht die vollständige Deglycosylierung (AK-I) erreicht wurde. Eine mögliche Erklärung für die unvollständige Deglycosylierung liegt in der Probenvorbereitung. Der enzymatische Verdau fand nicht in Lösung statt, da das Enzym auf Agarosekügelchen immobilisiert war, um zusätzliche Reinigungsschritte zu vermeiden. Dies könnte eventuell die Zugänglichkeit zur Schnittstelle am Antikörper eingeschränkt haben, sodass weder durch eine verlängerte Inkubationsdauer von 24 Stunden noch eine Erhöhung der Temperatur eine signifikante Steigerung der Deglycosylierungsausbeute erzielt werden konnte. Die Massendifferenzen zwischen der ersten und der zweiten sowie der zweiten und dritten Ladungsserie liegen in derselben Größenordnung bei ca. 1.300 Da. Aufgrund dieser Daten lassen sich leider auch keine genaueren Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Glycanreste gewinnen, als bereits durch den Verdau mit PNGase F (vgl. **Tab. 3.1**). Bei der vollständig deglycosylierten Spezies (AK1) wird zweimal eine Massendifferenz von ca. 146 Da detektiert. Dies unterstützt die Vermutung, dass der Antikörper symmetrisch und unsymmetrisch sowohl mit als auch ohne Kernfucosylierung vorliegen kann. Die weiteren Massendifferenzen sind wegen mangelnder Auflösung nicht eindeutig bestimmten PTMs zuordenbar. Bei der teildeglycosylierten Spezies findet sich erwartungsgemäß auch die Massendifferenz von ca. 146 Da für unterschiedliche Mengen an Fucoseresten, sowie ein Unterschied im Bereich von 160 Da, der für Unterschiede in der Galactosylierung spricht. Auch hier werden noch weitere Mikroheterogenitäten erwartet, die jedoch ebenfalls nicht aufgelöst werden konnten. An dieser Stelle sei erneut auf die Sequenzierung des Antikörpers mittels Proteolyse und anschließender Tandem-MS verwiesen (**Kapitel 3.1.3**). Die Betrachtung des Signals des glycosylierten Antikörpers bietet keine neuen Erkenntnisse, da die Abundanz sehr gering ist und die Auflösung deutlich schlechter als bei der Analytik des nativen cPAK. Neben der Verringerung der Mikroheterogenität des Antikörpers durch Deglycosylierung bietet die Spaltung des Antikörpers in kleinere Fragmente einen vielversprechenden Ansatz weitere näherer Erkenntnisse über dessen Zusammensetzung zu gewinnen. Zu diesem Zweck ist der

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Antikörper bei 37 °C bzw. 90 °C mit 25 mM TCEP-Lösung in verschiedenem Überschuß bezüglich des eingesetzten cPAK reduziert und zunächst gelektrophoretisch analysiert worden (Abb. 3.10).

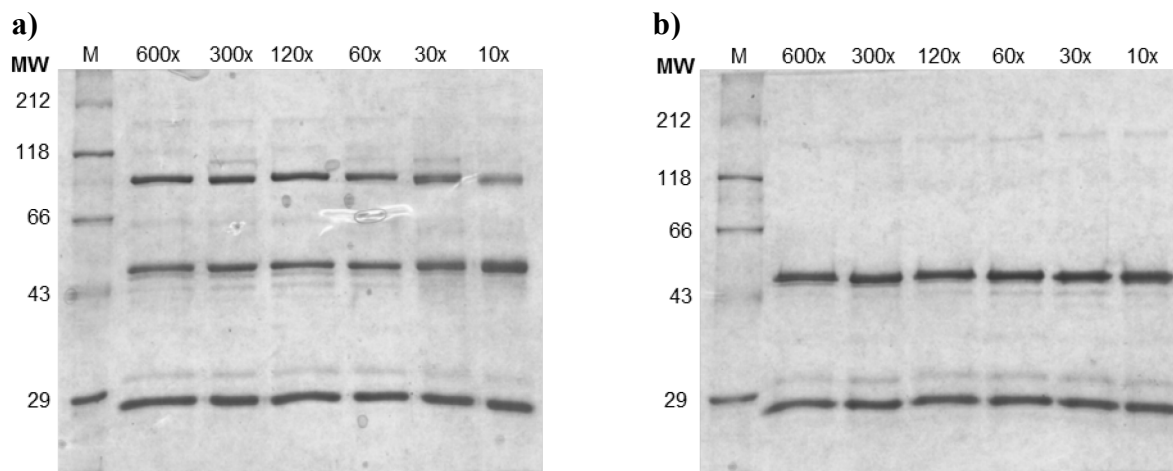
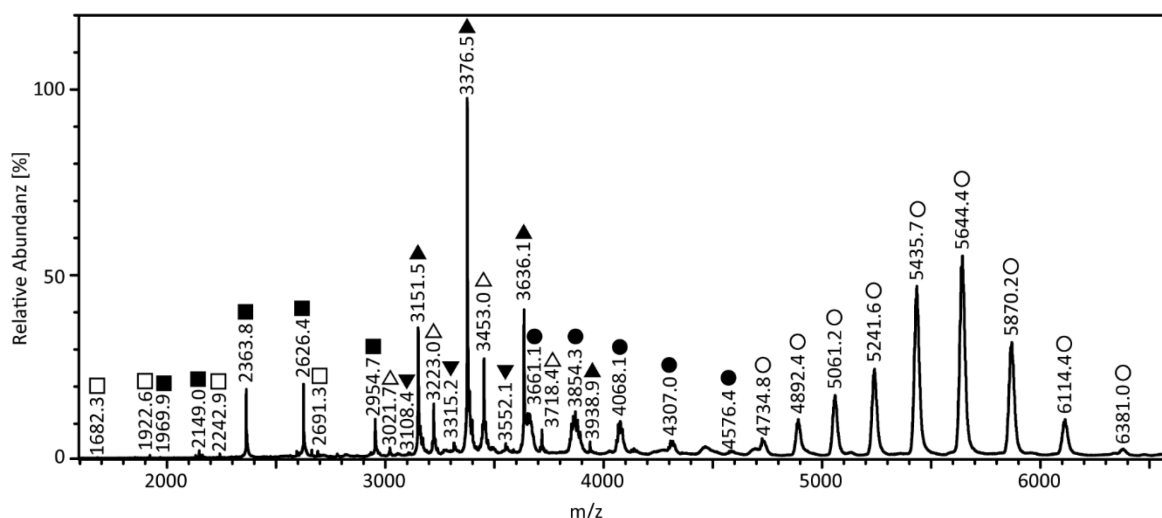


Abbildung 3.10: 10%-ige SDS-Gele der Reduktion des cPAK mit 25 mM TCEP-Lösung in 10 - 60-fachem Überschuß bezüglich des Antikörpers (je 0,5 µg) durch zehnminütige Inkubation bei **a)** 37 °C und **b)** 90 °C.

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei zehnminütiger Inkubation bei 37 °C offenbar keine vollständige Reduktion stattgefunden hat, da neben den erwarteten Banden bei ca. 25 kDa und 50 kDa eine weitere Bande bei ca. 90 kDa auftaucht. Bei 90 °C hingegen wird auch bei nur 10-fachem Überschuss die vollständige Reduktion des Antikörpers erzielt. Um möglichst viele unterschiedliche Fragmente, also auch teilreduzierten Antikörper, massenspektrometrisch charakterisieren zu können, wurde für die nachfolgende Analytik bei 37 °C reduziert. Das resultierende Spektrum ist in **Abb. 3.11** gezeigt. Zunächst fällt auf, dass – anders als das Gel vermuten lässt – eine Signalserie für den nicht-reduzierten Antikörper (O, Ladung 23+ – 31+) identifiziert werden kann. Die Feinstrukturen sind zwar deutlich schlechter aufgelöst als bei der Analytik des nativen cPAK, das Molekulargewicht der abundantesten Spezies mit 146.730,9 (\pm 7,3) Da stimmt aber unter Berücksichtigung der Standardabweichung gut mit dem vorher bestimmten überein. Da das Reduktionsmittel vor der Analytik mittels Zentrifugalfilter abgetrennt wurde, wäre eine Reoxidation, d.h. eine erneute Knüpfung der Interstrang-Disulfidbrücken, durchaus vorstellbar. Möglich wären auch rein nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den beiden Hälften des Antikörpers. Diese treten laut Literatur aber ausschließlich zwischen den C_H3-Regionen des Antikörpers auf, während die C_H2-Regionen über die Disulfidbrücken wechselwirken.^[268] Unvollständige Reduktion bzw. Reoxidation erscheint demnach wahrscheinlicher. Im Massenspektrum sind zusätzlich zu den Signalen des vollständigen Antikörpers sechs weitere Ladungsreihen erkennbar.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION



	●			▲	△	▼	■	□
Zuordnung	HC*LC			LC ₂	-	HC	LC	-
MW [Da]	73.205,9 (± 3,9)	73.361,0 (± 2,5)	73.533,7 (± 5,2)	47.256,3 (± 1,1)	48.328,5 (± 1,5)	49.715,4 (± 2,3)	23.628,1 (± 0,8)	13.451,3 (± 0,6)
Δ MW [Da]		-154,4 (± 5,5)	-172,7 (± 6,7)					

Abbildung 3.11: Ausschnitt des nano-ESI Q-ToF-Massenspektrums des reduzierten cPAK ($c \approx 1$ mg/mL in 200 mM NH_4OAc) bei einer KE von 100 eV. Die jeweils zu einer Ladungsserie gehörenden Signale sind unterschiedlich markiert.

Die ●-markierten Signale (Ladung $16+ - 20+$) gehören zu einer Spezies mit der Masse von $73.205,9 (\pm 3,9)$ Da. Bei genauerer Betrachtung können hier mindestens drei Feinstrukturen identifiziert werden. Die Massendifferenzen liegen bei $154,4 (\pm 5,5)$ Da bzw. $172,7 (\pm 6,7)$ Da und passen daher recht gut zu unterschiedlichen Glycosylierungsmustern an der schweren Kette. Mangelnde Auflösung verhindert eine genauere Zuordnung zu bestimmten Zuckerstrukturen. Bei den entsprechend identifizierten drei Fragmenten dürfte es sich um den halbierten Antikörper handeln, also die Kombination aus einer schweren und einer leichten Kette (HC*LC). Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen von ROUSSEAU *et al.*, die zeigten, dass die Disulfidbrücken der Gelenkregion in Ratten-IgG2a besonders anfällig sind und unter reduktiven Bedingungen zuerst gespalten werden.^[151]

Die ■-markierten Signale (Ladung $8+ - 12+$) lassen sich eindeutig der leichten Kette zuordnen. Auf die Bildung des entsprechend korrespondierenden HC_2^*LC -Fragments (erwartete Masse ca. 122 kDa) lassen sich im Spektrum jedoch keine Hinweise finden. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass zunächst stets das HC*LC-Fragment gebildet wird, aus dem wiederum die leichte Kette reduktiv freigesetzt wird. Bei den entsprechenden Signalen können keine Feinstrukturen sondern nur eine einzige Spezies mit einem Molekulargewicht von $23.628,1 (\pm 0,8)$ Da identifiziert werden. Die Masse liegt 61 Da über der theoretischen, aus der Sequenz berechneten. Dies könnte entweder ein Phänomen unvollständiger Desolvatisierung oder einer

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

PTM sein. Dies sollte sich mittels Proteolyse des Antikörpers und hochauflösender MS/MS-Analytik eindeutig klären lassen. Im ähnlichen niedrigen m/z -Bereich findet sich zudem eine Ladungsserie (\square , Ladung $5+ - 8+$) mit einer Fragmentmasse von $13.451,3 (\pm 0,6)$ Da. Dies deutet darauf hin, dass es innerhalb des Antikörpers andere Bruchstellen abseits der Cysteinbrücken gibt, an denen es bevorzugt zu Spaltung kommen kann. Ungefähr 14 kDa große Fragmente wurden auch bei Stabilitätsuntersuchungen an therapeutischen IgG1 und gefunden und mit einer Spaltung innerhalb der C_{H1} -Domäne assoziiert.^[269]

Die restlichen drei mit Dreiecken markierten Signalserien (Ladung $16+ - 20+$) gehören zu Fragmenten mit Molekulargewichten knapp unterhalb von 50 kDa. Das schwerste Fragment (\blacktriangledown) besitzt eine Masse von $49.715,4 (\pm 0,2)$ Da und gehört wahrscheinlich zur glycosylierten schweren Kette. Dafür spricht die Tatsache, dass die Addition dieser Masse mit der als LC identifizierten Spezies dann genau die 73 kDa des halben Antikörpers ($HC*LC$) ergibt. Die Signalintensität von LC und HC liegen zudem in derselben Größenordnung. Feinstrukturen sind aufgrund der geringen Abundanz und Auflösung nicht zu erkennen. Die intensivste Signalserie (\blacktriangle) besitzt eine Masse von $47.255,9 (\pm 0,5)$ Da. Dies entspricht bis auf eine Abweichung von weniger als 0,2 Da exakt dem doppelten Molekulargewicht der leichten Kette. Es scheint, als hätte eine oxidative Knüpfung der jeweils freien Cysteinreste unter Bildung eines LC_2 -Fragments untereinander stattgefunden. Diese Tatsache unterstützt weiterhin die Theorie, dass das Signal des vollständigen Antikörpers (\circ) ebenfalls ein Resultat einer Reoxidationsreaktion ist.

Die dritte Signalserie (\triangle) mit einer Masse von $48.328,5 (\pm 1,5)$ Da lässt sich nicht direkt eindeutig zuordnen. Aus diesem Grund wurden Literaturvergleiche angestellt. So ist durch vielfache Stabilitätsstudien an monoklonalen Antikörpern bekannt, dass Peptidbindungen in der oberen Gelenkregion relativ anfällig für hydrolytische Spaltungen sind.^[270, 269] Grund dafür sei vor allem die hohe Flexibilität und gute Zugänglichkeit der Aminosäuren verglichen mit denen in den Antikörperdomänen. Bei über einen längeren Zeitraum in Lösung gelagerten Antikörpern ist daher oft u.a. eine Freisetzung von Fab- bzw. Fc-Fragmenten feststellbar. Vergleicht man die ermittelten Molekulargewichte mit der Aminosäuresequenz, ergibt sich bei theoretischer Spaltung im Bereich der Gelenkregion eine Masse von ca. 48 kDa für das Fab- und von ca. 49 kDa für das Fc-Fragment. Die exakte Masse schwankt abhängig davon an welcher Aminosäure die Spaltung stattfindet. Aufgrund der massenspektrometrischen Datenlage kann man in diesem Fall lediglich spekulieren. Prinzipiell wurde bereits festgestellt, dass eine unvollständige Reduktion bzw. Reoxidation der Disulfidbrücken in der Lösung möglich ist, sodass die Existenz beider Fragmente vorstellbar erscheint. Die Entstehung des

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fab-Fragments aus dem halbierten AK dürfte aufgrund noch höherer Zugänglichkeit der Gelenkregion zusätzlich favorisiert werden. Die Verwendung des Reduktionsmittels könnte ebenfalls zusätzlich eine entscheidende Rolle spielen. So konnte durch Untersuchungen an cysteinhaltigen Modellpeptiden und -proteinen gezeigt werden, dass in Gegenwart von TCEP auch unter milden Bedingungen Spaltungen entlang des Peptidrückgrats auftreten.^[271] Dies geschieht ausschließlich an den Positionen, an denen Cystein in der Sequenz steht, und führt zur Bildung verschiedener heterogener N- und C-terminaler Fragmente (**Abb. 3.12a**), in diesem Fall entsprechend zur Bildung des N-terminalen Fab-Fragments.

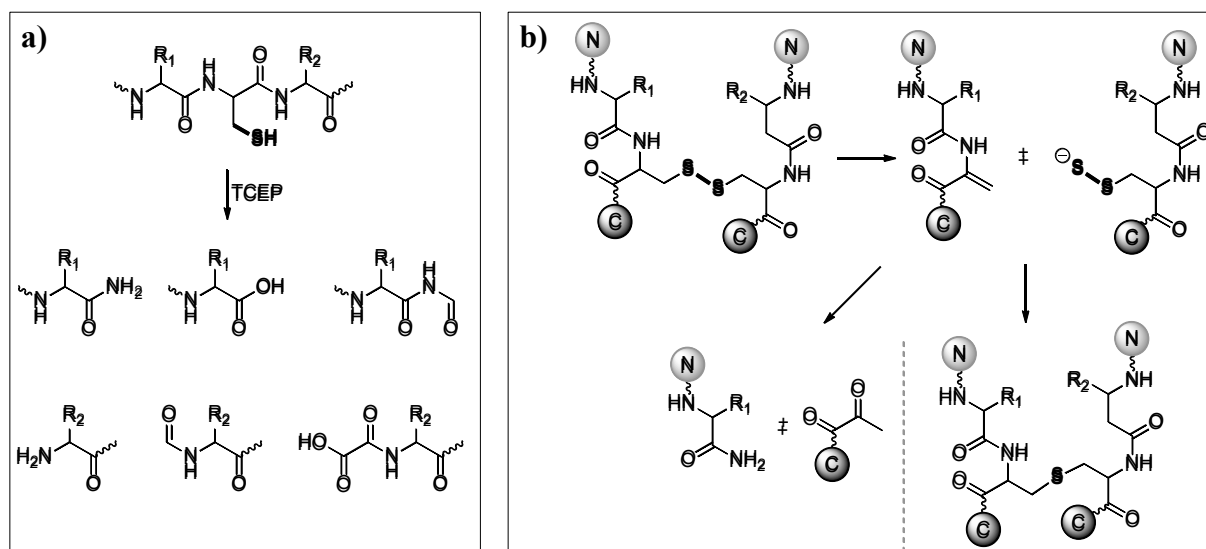


Abbildung 3.12: **a)** In Gegenwart von TCEP ist die Spaltung eines cysteinhaltigen Peptids sowohl an Peptid- als auch an C-C-Bindungen möglich. Die daraus resultierenden N- und C-terminalen Fragmente sind hier gezeigt. **b)** Mechanismus der Spaltung kovalenter Disulfidbrücken durch β -Eliminierung im ersten Schritt. Der gebildete Dehydroalaninrest kann entweder mit dem Sulfidrest eine Thioetherbrücke ausbilden oder das Peptid an entsprechender Stelle unter Ausbildung einer Amid- und eine Pyrovalgruppe hydrolytisch gespalten.

Für die Spaltung entlang von intakten Disulfidbrücken sind bisher zwei Mechanismen vorgeschlagen worden, die allerdings noch nicht vollständig geklärt sind (**Abb. 3.12b**).^[272] Beide beruhen zunächst auf der β -Eliminierung eines Protons unter der Bildung eines Dehydroalanin-Intermediats auf der einen und des Persulfids auf der anderen Seite. Beide können nun in einer Michael-Addition miteinander reagieren und eine kovalente Thioetherbrücke knüpfen. Geschieht dies an der HC-LC-Interstrang-Disulfidbrücke, wird ein kovalentes Fab-Fragment gebildet, das unempfindlich gegenüber reduktiver Spaltung ist. Dies könnte eventuell ein Grund sein, warum das cPAK Fab-Fragment, sofern denn korrekt zugeordnet, im Massenspektrum so abundant erscheint. Alternativ kann das Dehydroalanin hydrolysiert werden, was zur Bildung eines N-terminalen Peptidfragments mit Amidgruppe und eines C-terminalen Fragments mit einer Pyrovalgruppe führt. In diesem speziellen Fall scheint

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

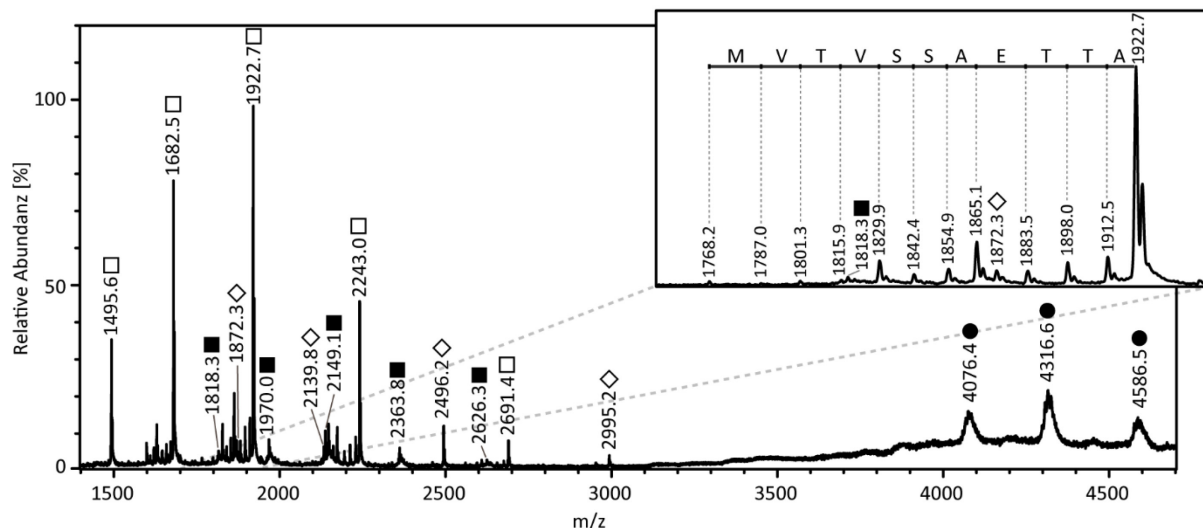
diese Reaktion jedoch eher unwahrscheinlich oder nur zu einem sehr geringen Prozentsatz stattzufinden, da zwar die leichte Kette nicht jedoch das entsprechend zu erwartende Fab-HC-Fragment (ca. 24 kDa) detektierbar ist. Auch das in jedem Fall zu erwartende Fc-HC-Fragment (ebenfalls ca. 24 kDa) kann nicht in dem Spektrum identifiziert werden. Man könnte spekulieren, dass entsprechende Signale im Spektrum möglicherweise überlagert werden oder die schwere Kette weiteren Spaltungsreaktionen unterliegt. Zumindest bei Untersuchungen an monoklonalen humanen und humanisierten IgG konnte gezeigt werden, dass die schwere Kette scheinbar anfälliger für nicht-enzymatische Spaltungen ist.^[273] Eventuell spielt dabei eine Rolle, dass die Fc-HC-Kette im Gegensatz zum Fab-Fragment wahrscheinlich keine Domänenstruktur mehr aufweist, was das Molekül stabilisieren würde. So erscheint eine vollständige Fragmentierung der HC wahrscheinlicher. Auf Basis der Ergebnisse kann man also die Vermutung anstellen, dass das 48,3 kDa große Fragment (Δ) dem Fab-Teil des Antikörpers entspricht, der durch Spaltung in der oberen Gelenkregion generiert wurde.

Fragmentierung des Antikörpers

Bei genauerer Betrachtung des Massenspektrums des nativen cPAK im niedrigen m/z -Bereich ($m/z < 5000$) ist ersichtlich, dass es bei einer Kollisionsenergie von 100 eV bereits ohne gezielte Fragmentierung ausgewählter Ionen zur Bildung verschiedener AK-Fragmente kommt (**Abb. 3.13**, Spektrum über den gesamten m/z -Bereich im Anhang). Wie bei der Analytik des reduzierten Antikörpers findet sich auch hier eine Signalserie (●, Ladung $16+ - 18+$) für den in der Gelenkregion gespaltenen halben Antikörper. Ausgehend von der kleinsten Masse von 73.080,2 ($\pm 7,6$) Da sind bis zu fünf Feinstrukturen eindeutig erkennbar. Aufgrund der Massendifferenzen von ca. 140 - 160 Da, kann auch hier auf die Existenz verschiedener Glycosylierungsmuster im Fc-Bereich geschlossen werden. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen, die bei der Reduktion des Antikörpers erzielt wurden. Obwohl die Abundanz der HC*LC-Signale niedriger liegt, ermöglicht die Auflösung eine bessere Zuordnung der Zuckerstrukturen. Des Weiteren kann auch das Fragment für die leichte Kette (■) mit einer Masse von 23.627,8 ($\pm 1,2$) Da gefunden werden. Während der Probenvorbereitung lagen keine reduzierenden Bedingungen vor und auch bei der Analytik mittels SDS-PAGE sind keine zusätzlichen Banden sichtbar. Entweder ist die Konzentration an teilreduziertem Antikörper so gering, dass das Fragment auf dem Gel nicht sichtbar ist, oder die Spaltung hat innerhalb des Massenspektrometers stattgefunden. Höchstwahrscheinlich geschieht dies unbeabsichtigt innerhalb des zweiten Hexapols, wo durch die Verwendung von Argon als Kollisionsgas die

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Desolvatisierung der Ionen erhöht werden soll. Von diesem Phänomen sind scheinbar nicht nur die Disulfidbrücken betroffen, wie die Existenz einer Ladungsserie für ein Fragment mit der Masse $14.971,0 (\pm 0,5)$ Da (\diamond , Ladung $5+ - 8+$) und das bereits bei der Reduktion identifizierte Fragment mit $13.451,9 (\pm 0,3)$ Da (\square , Ladung $5+ - 9+$) nahelegt.



	●					■	◇	□	b_{123}	b_{122}
Zuordnung	HC*LC					LC	-	V _H	(-A)	(-T)
MW [Da]	73080,2 ($\pm 7,6$)	73218,0 ($\pm 1,5$)	73363,9 ($\pm 4,5$)	73520,3 ($\pm 3,8$)	73667,4 ($\pm 7,4$)	23627,8 ($\pm 1,2$)	14971,0 ($\pm 0,5$)	13451,9 ($\pm 0,3$)	13380,9 ($\pm 0,1$)	13279,3 ($\pm 0,2$)
Δ MW [Da]		-137,7 ($\pm 8,9$)	-145,9 ($\pm 5,9$)	-156,4 ($\pm 8,2$)	-147,1 ($\pm 8,5$)				-71,1 ($\pm 0,2$)	-101,6 ($\pm 0,1$)

	b_{121}	b_{120}	b_{119}	b_{118}	b_{117}	b_{116}	b_{115}	b_{114}	b_{113}
Zuordnung	(-T)	(-E)	(-A)	(-S)	(-S)	(-V)	(-T)	(-V)	(-M)
MW [Da]	13177,8 ($\pm 0,5$)	13048,3 ($\pm 0,1$)	12976,9 ($\pm 0,1$)	12889,6 ($\pm 0,5$)	12802,3 ($\pm 0,1$)	12703,4 ($\pm 0,8$)	12601,9 ($\pm 0,5$)	12502,3 ($\pm 0,5$)	12370,5 ($\pm 0,2$)
Δ MW [Da]	-101,5 ($\pm 0,3$)	-129,4 ($\pm 0,5$)	-71,5 ($\pm 0,1$)	-87,3 ($\pm 0,5$)	-87,0 ($\pm 0,6$)	-98,9 ($\pm 0,9$)	-101,5 ($\pm 0,7$)	-99,6 ($\pm 0,2$)	-131,8 ($\pm 0,4$)

Abbildung 3.13: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des cPAK ($c = 1$ mg/mL in 200 mM NH_4OAc) bei einer KE von 100 eV und Vergrößerung des m/z -Bereichs um das siebenfach geladene Signal bei $m/z = 1922,7$. Aus den Massendifferenzen zwischen den b -Ionen lässt sich die Sequenz ablesen und der V_H-Region des cPAK zuordnen.

Bei Vergrößerung des m/z -Bereichs des siebenfach geladenen Signals der 13,4 kDa-Serie (\square) erkennt man deutlich elf weitere Signale, die sich alle diskreten Fragmenten zuordnen lassen. Die Differenzen entsprechen jeweils exakt der Abspaltung einer einzelnen Aminosäure, woraus sich die Teilsequenz MVTVSSAETTA ergibt. Diese kann eindeutig dem N-terminalen Teil der schweren Kette zugeordnet werden. Die Abweichung von der theoretisch aus der Sequenz kalkultierten Masse liegt bei weniger als 1 Da. Die Spaltstelle zwischen Ala¹²⁴ und Pro¹²⁵ befindet sich am Übergang zwischen C_{H1}- und V_H-Region. Der Vergleich mit Fragmentierungsmustern mittels MS/MS analysierter Peptide zeigt, dass der N-terminale Bindungsbruch zu Prolin gegenüber anderen Peptidbindungen stark bevorzugt ist (sog.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

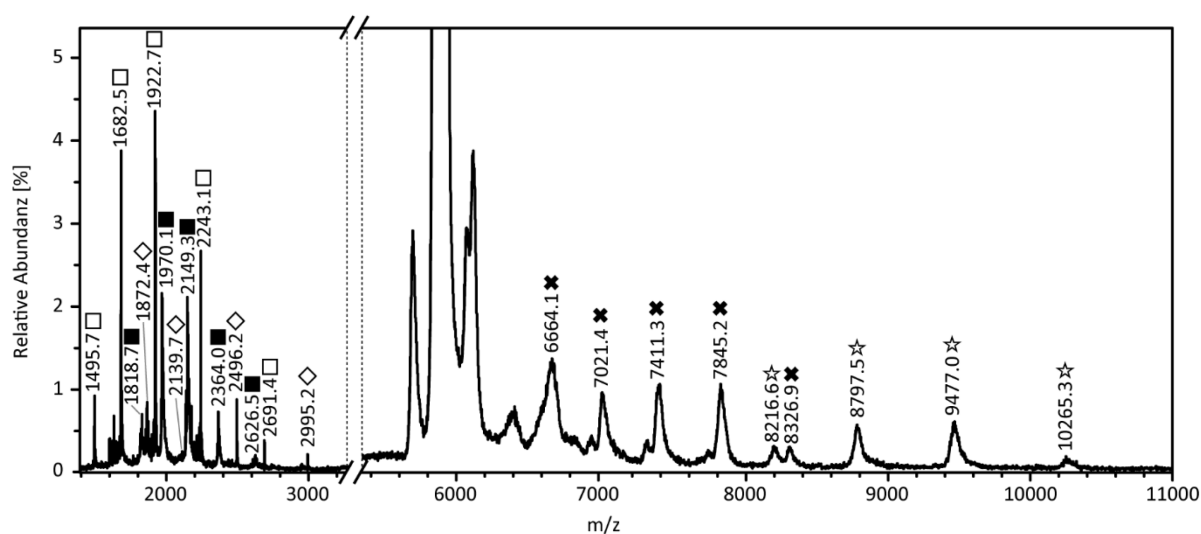
Prolineffekt). Es wird angenommen, dass dies eine Folge der einzigartigen Struktur der Aminosäure und auch der vergleichsweise hohen Gasphasenbasizität ist. Dies führt dazu, dass Fragmente mit N-terminalem Prolin oft überproportional häufiger in CID-MS/MS-Spektren zu finden sind als andere y- und b-Fragmente.^[274-275] Im Fall des cPAK kommt hinzu, dass sich das Pro¹²⁵ außerhalb der Domänenstruktur befindet und deshalb wahrscheinlich besonders zugänglich ist bzw. die Sequenz nicht durch die umgebende Struktur stabilisiert wird. Im Massenspektrum sind ausschließlich die N-terminalen b-Fragmentserien identifizierbar, die komplementären Fragmente konnten nicht detektiert werden. Man könnte vermuten, dass das 14,9 kDa große Fragment (◇) ebenfalls aus einer N-terminalen Spaltung an einem Prolin resultiert. Im Spektrum finden sich jedoch keine Signale, die einer sequentiellen Abspaltung von Aminosäuren aus ebendiesem Fragment entsprechen, sodass eine Zuordnung zu einer bestimmten Region des Antikörpers nicht möglich ist.

Das 13,4 kDa große V_H-Fragment (□) wie auch das 14,9 kDa große Fragment (◇) konnten ebenfalls sowohl in den nativen Massenspektren des mittels PNGase F als auch mittels Endo S deglycosylierten Antikörpers als Serie von mindestens drei Ladungszuständen identifiziert werden (Spektren im Anhang). Zum einen kann dadurch ausgeschlossen werden, dass das 14,9 kDa große Fragment Teil der C_{H2}-Region ist, da sich das aus der entsprechenden Signalserie berechnete Molekulargewicht nach Abspaltung der Glycanstrukturen nicht ändert. Zum anderen unterstützt dies zusätzlich die These, dass die Fragmente durch die Spaltung einer scheinbar labilen Bindung innerhalb des AKs entstehen, da deren Generierung unter verschiedenen Bedingungen bezüglich der Probenvorbereitung reproduzierbar ist.

Um weitere Sequenzinformationen bzw. Hinweise auf bevorzugte Stellen für Bindungsbrüche innerhalb des Antikörpers zu bekommen, wurden die vier intensivsten Vorläuferionen der Antikörpersignalserie (Ladungszustand: 23+, 24+, 25+, 26+) isoliert und diskreten Kollisionsenergien von 100 eV, 150 eV und 200 eV ausgesetzt. Als Beispiel sei zunächst das MS/MS-Spektrum des 25-fach geladenen Antikörperions bei 100 eV gezeigt (**Abb. 3.14**). Bei einer KE von 100 eV können wie bei der Analytik des Antikörpers unter nativen Bedingungen das 23.630,2 (± 0,8) Da große Fragment für die leichte Kette (■), das 13.452,2 (± 0,3) Da Fragment für die N-terminale V_H-Region (□) sowie das 14.971,2 (± 0,1) Da Fragment (◇) identifiziert werden. Die kleinen Fragmente weisen alle eine sehr geringe Standardabweichung auf und stimmen von den Absolutwerten sehr gut mit erhaltenen Daten aus der reduktiven Spaltung bzw. der Analytik des Antikörpers ohne gezielte MS/MS-Experimente überein. Hinzu kommen zwei Signalserien für größere Fragmente im m/z-Bereich zwischen 6.500 und 11.000. Das ☆-markierte Fragment besitzt eine Masse von 123.186,2 (± 70,0) Da und bildet

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

wahrscheinlich das korrespondierende Fragment zur leichten Kette, bestehend also aus einer leichten und zwei schweren Ketten (HC_2^*LC). Dieses scheint zumindest bei einer Kollisionsenergie von 100 eV relativ stabil zu sein. Im Vergleich dazu wurde unter reduktiven Bedingung nur die leichte Kette gefunden. Daraus könnte man schlussfolgern, dass die Gelenkregion zwar anfällig für reduktive Spaltung ist, gegenüber der Energiezufuhr durch Stöße in der Kollisionszelle jedoch weniger empfindlich ist.^[276] Diese These wird dadurch unterstützt, dass im Massenspektrum keine Signale zu finden, die auf eine weitere Abspaltung einer schweren Kette und entsprechende Bildung des halben Antikörpers schließen lassen.



	✱	□	☆	■	◇
Zuordnung	cPAK - V _H	V _H	HC ₂ *LC	LC	-
MW [Da]	133.319,8 (± 70,0)	13.452,2 (± 0,3)	123.186,2 (± 30,6)	23.630,2 (± 0,8)	14.971,2 (± 0,1)

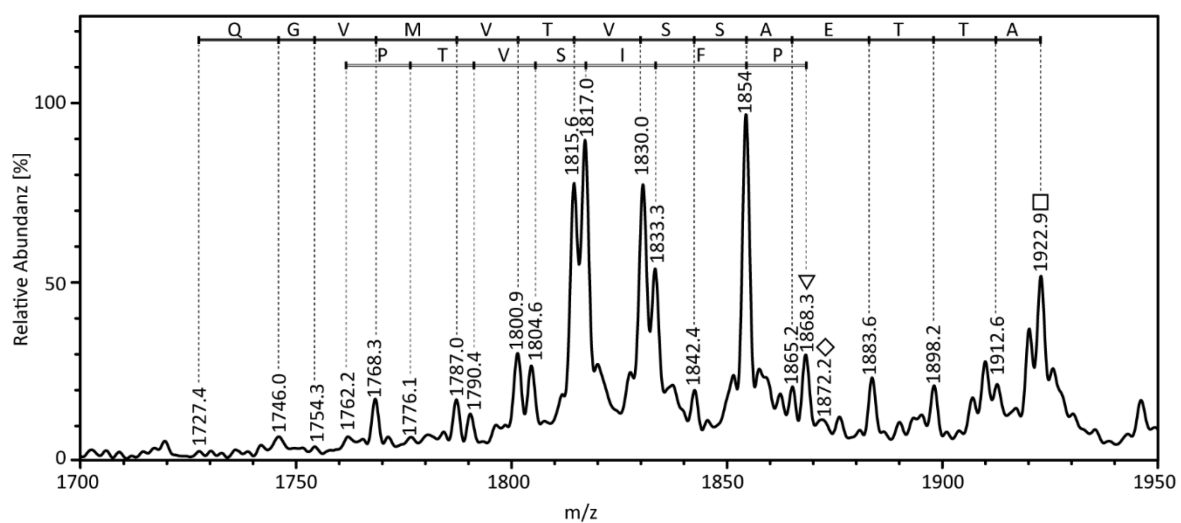
Abbildung 3.14: Nano-ESI Q-ToF-MS/MS-Spektrum des 25-fach geladenen Signals des cPAK bei einer KE von 100 eV. Es können zweimal je zwei korrespondierende Fragmente (✱/□ bzw. ☆/■) sowie ein einzelnes Fragment (◇) aus den Ladungsserien zugeordnet werden.

Des Weiteren kann noch ein Fragment mit einem Molekulargewicht von 133.319,8 kDa (✱) identifiziert werden. Dieses dürfte dem Rest des Antikörpers entsprechen, nachdem eine Spaltung am Pro¹²⁵ im Bereich zwischen C_H1 und V_H stattgefunden hat (cPAK – V_H). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Pro¹²⁵ tatsächlich eine sehr bevorzugte Bruchstelle und dass diese mindestens so labil wie die Interstrang-Disulfidbrücke ist, die die schwere und leichte Kette miteinander verbindet. Aus den Signalen der großen Fragmente können keine weiteren Informationen gewonnen werden. Am 13,4 kDa V_H-Fragment (□) lässt sich wie bei der nativen Analytik des cPAK ohne Isolation und gezielter Fragmentierung des Ions die sequentielle Abspaltung der Aminosäuren verfolgen (vgl. Abb. 3.13). In diesem Fall können jedoch nur neun b-Fragmente einwandfrei identifiziert werden, was der Abdeckung des Sequenzabschnitts

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

TVSSAETTA entspricht. Die Abweichungen in den berechneten Molekulargewichten der Fragmente liegen unterhalb von 1 Da.

Die Erhöhung der Kollisionsenergie auf 150 eV führt erwartungsgemäß insgesamt zur Zunahme der relativen Abundanz der Fragmentsignale im Vergleich zum Signal des Vorläuferions. Im niedrigen m/z -Bereich verschiebt sich die Ladungsserie der LC (■) leicht zu weniger stark geladenen Spezies (Ladungszustand 7+ – 11+ statt 9+ – 13+). Des Weiteren können auch neue Signale ausgemacht werden. Die Sequenz des 13,4 kDa großen Fragments der V_H -Region (□) kann entlang der Abspaltung der 14 Aminosäuren QGVMVTVSSAETTA bis zum b_{110} -Fragment beobachtet werden (Abb. 3.15).



	▽	b_{118}	b_{117}	b_{116}	b_{115}	b_{114}	b_{113}	b_{112}
Zuordnung	V_L	(-P)	(-F)	(-I)	(-S)	(-V)	(-T)	(-P)
MW [Da]	13.070,5 ($\pm 0,1$)	12.973,2 ($\pm 0,2$)	12.825,9 ($\pm 0,1$)	12.712,3 ($\pm 0,2$)	12.624,7 ($\pm 0,4$)	12.525,5 ($\pm 0,1$)	12.424,8 ($\pm 0,9$)	12.327,1 ($\pm 0,7$)
Δ MW [Da]		-97,3 ($\pm 0,1$)	-147,3 ($\pm 0,2$)	-113,6 ($\pm 0,3$)	-87,6 ($\pm 0,6$)	-99,2 ($\pm 0,3$)	-100,7 ($\pm 0,8$)	-97,7 ($\pm 0,7$)

	□	b_{123}	b_{122}	b_{121}	b_{120}	b_{119}	b_{118}	b_{117}	b_{116}
Zuordnung	V_H	(-A)	(-T)	(-T)	(-E)	(-A)	(-S)	(-S)	(-V)
MW [Da]	13.452,8 ($\pm 0,6$)	13.382,1 ($\pm 1,4$)	13.280,8 ($\pm 0,7$)	13.178,7 ($\pm 0,6$)	13.049,0 ($\pm 0,1$)	12.977,3 ($\pm 0,3$)	12.889,8 ($\pm 0,2$)	12.802,4 ($\pm 0,3$)	12.702,5 ($\pm 0,1$)
Δ MW [Da]		-70,9 ($\pm 1,3$)	-101,3 ($\pm 0,7$)	-102,1 ($\pm 1,0$)	-129,8 ($\pm 0,6$)	-71,6 ($\pm 0,3$)	-87,5 ($\pm 0,5$)	-87,4 ($\pm 0,5$)	-99,9 ($\pm 0,6$)

	b_{115}	b_{114}	b_{113}	b_{112}	b_{111}	b_{110}
Zuordnung	(-T)	(-V)	(-M)	(-V)	(-G)	(-Q)
MW [Da]	12.601,4 ($\pm 1,4$)	12.502,4 ($\pm 0,6$)	12.371,1 ($\pm 0,4$)	12.272,1 ($\pm 0,8$)	12.214,7 ($\pm 0,4$)	12.084,6 ($\pm 0,1$)
Δ MW [Da]	-101,1 ($\pm 1,1$)	-99,0 ($\pm 1,1$)	-131,3 ($\pm 0,5$)	-99,4 ($\pm 0,8$)	-57,4 ($\pm 0,3$)	-130,1 ($\pm 0,4$)

Abbildung 3.15: Ausschnitt des Nano-ESI Q-ToF-MS/MS-Spektrums des 25-fach geladenen Signals des cPAK bei einer KE von 150 eV. Es können insgesamt zwei b-Fragmentationsserien (V_H = 13,4 kDa (□) und V_L = 13,0 kDa (▽)) identifiziert und der entsprechenden Sequenz des cPAK zugeordnet werden. Der Ausschnitt zeigt nur die 7-fach geladenen b-Ionen, es existieren aber jeweils auch die 8- bzw. 6-fach geladenen Spezies.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ausgehend von einem $13.070,5 (\pm 0,3)$ Da großen Fragment kann weiterhin eine neue intensive Signalserie (∇) identifiziert werden. Bei der Sequenz PTVSIFP handelt es sich um den N-terminalen Rest der leichten Kette (V_L), die am Pro^{120} gespalten wurde. Wie bereits bei dem Fragment der schweren Kette beruht die Spaltung wahrscheinlich auf dem Prolineffekt. Da sich an der Aminosäureposition 119 ebenfalls ein Prolin befindet, kann die erste Spaltung ebenso an dieser Stelle stattfinden. Die Tatsache, dass das b_{118} -Ion die vergleichsweise höchste Abundanz aufweist, spricht dafür, dass die Spaltung bevorzugt am Pro^{119} stattfindet. Mit weiter zunehmender Kollisionsenergie auf 200 eV werden hier keine neuen Fragmente gebildet (Spektrum nicht gezeigt). Die einzelnen b-Ionen der 13,4 kDa und 13,0 kDa Fragmente werden nur zunehmend intensiver, während das 14,9 kDa Fragment vergleichsweise an Intensität abnimmt. Dieses kann nach wie vor keinem Sequenzabschnitt des cPAK zugeordnet werden. Die relative Abundanz der V_H - und V_H -Fragmentsignale nimmt im Vergleich zum Vorläuferion deutlich zu, während die relative Intensität zueinander gleich bleibt.

Auch im hohen m/z -Bereich führt die Erhöhung der Kollisionsenergie von 100 eV auf 150 eV zu einer Signalintensivierung. In diesem Fall weisen die Serien der 133,3 kDa (\times , cPAK – V_H) und der 123,1 kDa Spezies (\star , HC_2^*LC) entsprechend den korrespondierenden Signalen im niedrigen m/z -Bereich eine höhere relative Abundanz auf (**Abb. 3.16**).

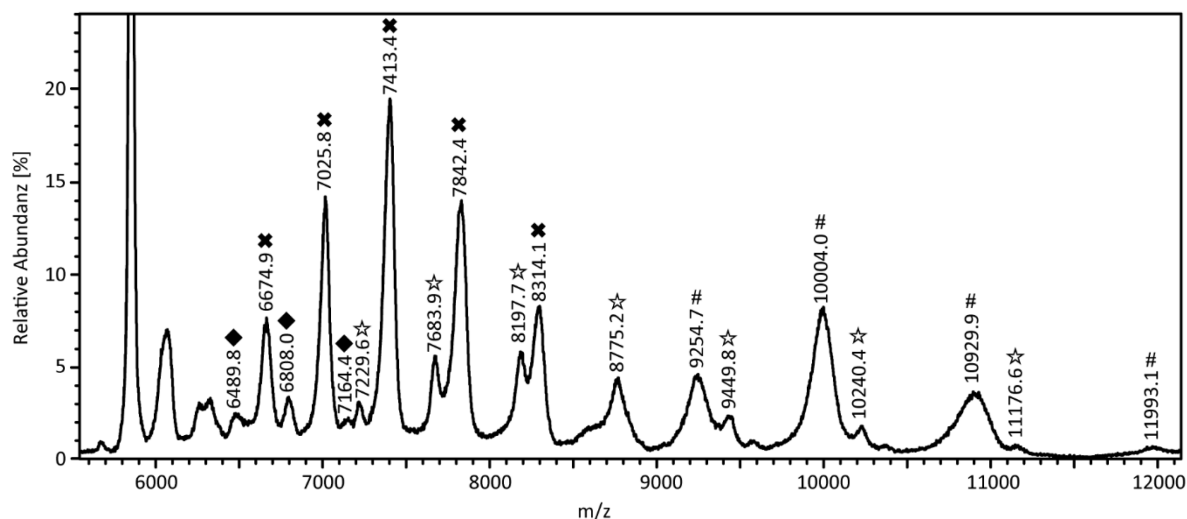


Abbildung 3.16: Ausschnitt des Nano-ESI Q-ToF-MS/MS-Spektrums des 25-fach geladenen Signals des cPAK bei einer KE von 200 eV. Neben den bereits bekannten Fragmenten für „cPAK - V_H “ (\times) und HC_2^*LC (\star) können zwei weitere Signalserien ($\#$, \diamond) identifiziert werden, von denen eine dem „cPAK - 2^*V_L “-Fragment ($\#$) zugeordnet werden kann. Eine tabellarische Übersicht über die exakten Molekulargewichte aller Fragmente findet sich in **Abb. 3.18**.

Neben den bekannten Fragmenten tauchen zwei neue Signalserien auf, eines mit einer Masse von $136.170,0 (\pm 68,5)$ Da (\diamond) und das andere mit $120.179,3 (\pm 95,2)$ Da ($\#$). Letzteres weist bezüglich des Molekulargewichts der abundantesten Antikörperspezies eine Massendifferenz

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

von 26.540,0 Da auf. Vergleicht man dies mit den leichten Fragmenten, zeigt sich, dass die Differenz gut zur Abspaltung zweier V_L-Fragmente passt. Im Gegensatz zur Abspaltung des V_H-Fragments wird hier scheinbar an beiden leichten Ketten des Antikörpers gleichzeitig abgespalten (cPAK – 2*V_L). In keinem Fall wird im Massenspektrum ein passendes Antikörperfragment detektiert, aus dem nur ein V_L-Fragment abgespalten wurde (erwartete Masse ca. 133,4 kDa). Das 136,1 kDa Fragment ist um ca. 10 kDa leichter als der vollständige Antikörper, jedoch kann keine Signalserie identifiziert werden, die diesem korrespondierenden Fragment entsprechen würde. Wenn man sich die Aminosäuresequenz des Antikörpers anschaut, sind eine Reihe Proline enthalten. Da diese, abgesehen von den Disulfidbrücken, die vornehmliche Bruchstelle zu sein scheinen, könnte man spekulieren, dass die Fragmentierung an definierten exponierten Stellen stattfindet. Die Bildung der V_L- und V_H-Fragmente lässt vermuten, dass sich entsprechendes Prolin außerhalb der geschützten Domänenregionen des Antikörpers befindet. Da jedoch keine kleinen Fragmente nachgewiesen werden können, die durch die Bildung von b-Ionen eine zusätzliche Sequenzinformation bieten könnten, lässt sich hier keine genauere Aussage treffen.

Vergleicht man die Fragmentierungsmuster aller vier AK-Vorläuferionen im niedrigen m/z-Bereich von 1.400 – 3.000, so sehen diese nahezu identisch aus. Wie zu erwarten können bei 100 eV jeweils übereinstimmend die Signalserien für die LC mit 23,6 kDa (■), für das 13,4 kDa V_H-Fragment (□) sowie das 14,9 kDa große Fragment (◇) zugeordnet werden (vgl. **Abb. 3.14**). Mit zunehmender Kollisionsenergie (KE ≥ 150 eV) wird jeweils auch das V_L-Fragment mit einer Masse von 13,0 kDa (▽) identifiziert (**Abb. 3.17**).

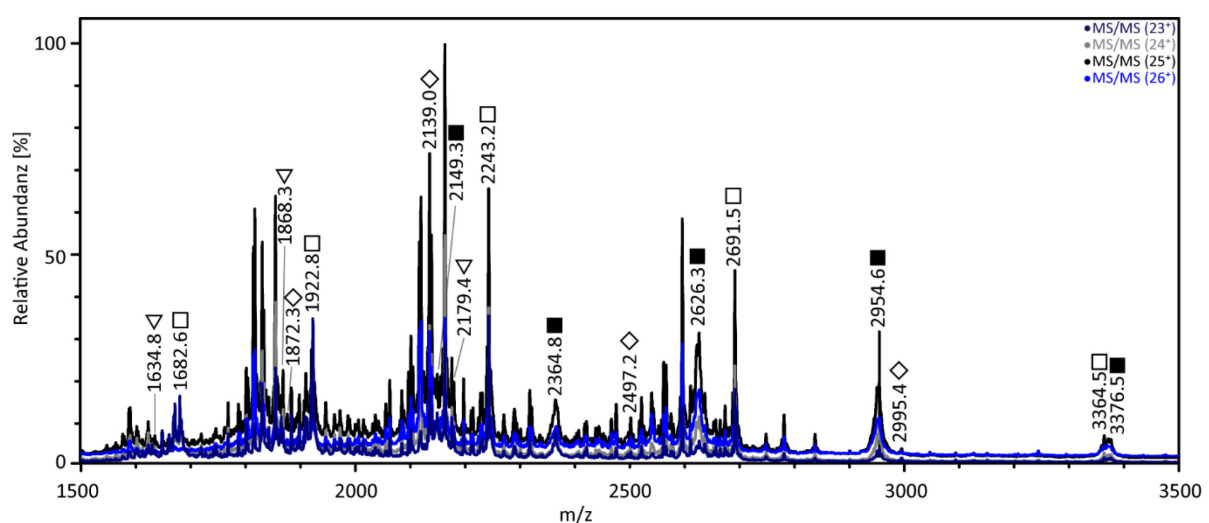
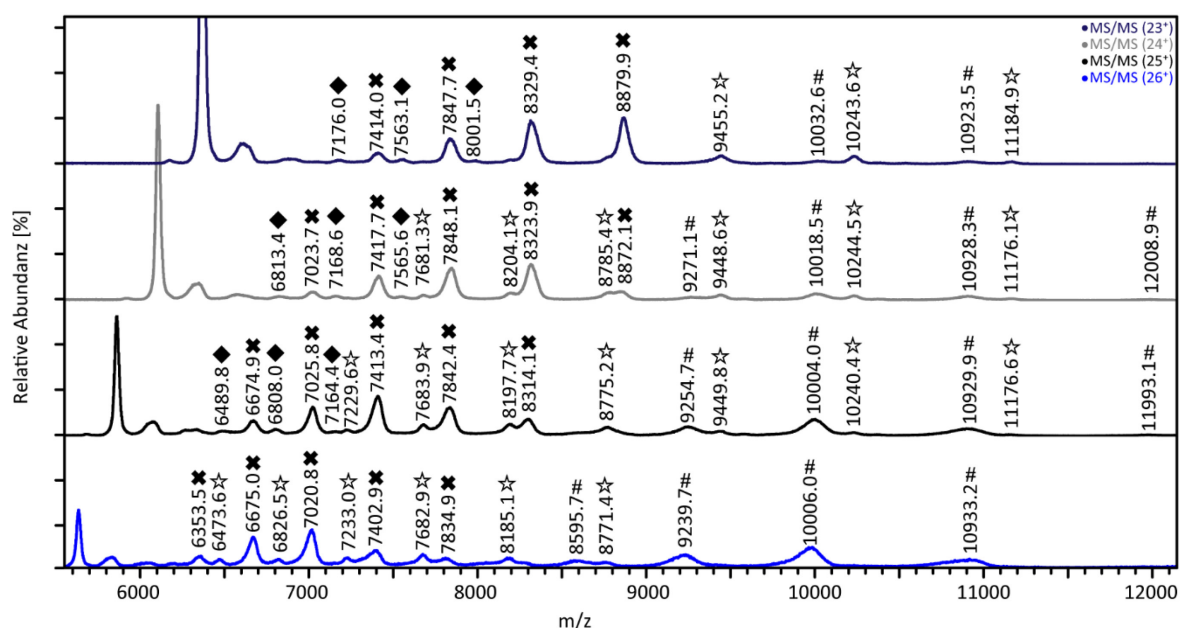


Abbildung 3.17: Ausschnitt der Nano-ESI Q-ToF-MS/MS-Spektren im m/z-Bereich von 1500 - 3500 der 26-fach (blau), 25-fach (schwarz), 24-fach (grau) und 23-fach (dunkelblau) geladenen Vorläuferionen bei einer KE von 200 eV.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Signalserien weisen nicht nur dieselbe Ladungsverteilung auf, sondern stimmen auch in der relativen Intensität zueinander innerhalb eines Spektrums überein. Unterschiede finden sich allein in der absoluten Signalintensität, die in der unterschiedlichen Abundanz der isolierten Ionen des jeweiligen Ladungszustands begründet liegt. Untereinander weichen die aus den jeweiligen Spektren errechneten Molekulargewichte um weniger als 1 Da voneinander ab und stimmen somit unter Berücksichtigung der ermittelten Unsicherheit für die einzelnen Werte exakt überein.

Bei den großen Fragmenten sind im Gegensatz dazu Unterschiede zwischen den einzelnen MS/MS-Spektren festzustellen, abhängig davon, welches der Vorläuferionen zur Fragmentierung isoliert wurde. Bei 100 eV werden für alle jeweils nur das HC₂*LC mit einer Masse von 122,9 kDa (☆) und das (cPAK – V_H)-Fragment mit 133,3 kDa (✕) identifiziert, jedoch – anders als bei den kleinen Fragmenten – mit unterschiedlichen Ladungsverteilungen. So entstehen erwartungsgemäß aus höher geladenen Vorläuferionen stärker geladene Fragmentionen. Dieser Trend setzt sich auch bei höheren Kollisionsenergien fort (Abb. 3.18).



	◆	✕	□	☆	■	#	▽
Zuordnung	-	cPAK - V _H	V _H	HC ₂ *LC	LC	cPAK - 2*V _L	V _L
MW ₂₃₊ [Da]	136.150,4 (± 131,5)	133.316,0 (± 101,9)	13.453,3 (± 0,4)	122.975,1 (± 68,7)	23.629,9 (± 1,9)	120.207,8 (± 122,6)	13.070,7 (± 0,4)
MW ₂₄₊ [Da]	136.198,3 (± 36,5)	133.313,3 (± 166,9)	13.453,2 (± 0,.)	122.912,7 (± 78,4)	23.630,3 (± 3,7)	120.250,1 (± 159,4)	13.070,7 (± 0,7)
MW ₂₅₊ [Da]	136.170,0 (± 68,5)	133.337,2 (± 175,1)	13.453,1 (± 0,4)	122.891,7 (± 42,8)	23.630,9 (± 3,8)	120.179,3 (± 95,2)	13.070,8 (± 0,3)
MW ₂₆₊ [Da]	-	133.334,0 (± 112,0)	13.453,3 (± 0,7)	122.873,4 (± 79,6)	23.629,9 (± 3,5)	120.185,9 (± 108,2)	13.070,7 (± 0,2)

Abbildung 3.18: Ausschnitt der Nano-ESI Q-ToF-MS/MS-Spektren im m/z-Bereich von 5500 - 12100 der 26-fach (blau), 25-fach (schwarz), 24-fach (grau) und 23-fach (dunkelblau) geladenen Vorläuferionen bei einer KE von 200 eV.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Des Weiteren fragmentieren die höher geladenen Fragmentionen stärker. So liegt bei einer Kollisionsenergie von 200 eV beispielsweise die relative Abundanz des 26-fach geladenen Antikörperion bei nur 29 % im Vergleich zu dem intensivsten Fragmentsignal, während es sich bei dem 23-fach geladene Vorläuferion auch nach der Kollision nach wie vor um die intensivste Spezies im Spektrum handelt. Ab 150 eV wird aus allen verschiedenen geladenen Antikörperionen zusätzlich das 120,2 kDa große (cPAK – 2*V_L)-Fragment (#) gebildet. Ab 200 eV wird für jedes Vorläuferion abgesehen von dem höchstgeladenen (26+) in den jeweiligen Spektren zusätzlich eine Signalserie für das 136,2 kDa große Fragment (◆) beobachtet. Man kann nicht mit Sicherheit ausschließen, dass das Fragment auch aus dem 26-fach geladenen Ion gebildet wurde, da die entsprechenden Signale vergleichsweise wenig intensiv sind und von der Lage wahrscheinlich im selben m/z-Bereich wie die hochgeladenen Ionen des HC₂*LC-Fragments (☆) zu verorten sind. Eine Signalüberlagerung ist demnach durchaus vorstellbar. Wie bereits anhand des MS/MS-Spektrum des 25-fach geladenen Vorläuferions vermutet, ist die Zuordnung zu einer definierten Region des Antikörpers nicht möglich, da auch in den anderen Spektren kein korrespondierendes ca. 10 kDa großes Fragment detektiert wird, aus dem eventuell Sequenzinformationen hätten gewonnen werden können. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse in Kombination mit der Tatsache, dass zur Entstehung des Fragments höhere Kollisionsenergien erforderlich sind, könnte man vermuten, dass die Fragmentierung wieder durch den Prolineffekt bedingt ist. Falls dies zutreffen sollte, dürfte es sich um eine Aminosäureposition handeln, die durch die dreidimensionale Antikörperstruktur besser geschützt ist. Allgemein lässt sich festhalten, dass aus allen vier Ladungszuständen jeweils immer mindestens drei Spaltungen hervorgehen, nämlich die der Interstrang-Disulfidbrücke zwischen HC und LC, am Pro¹²⁵ zwischen C_{H1}- und V_H-Region sowie am Pro¹¹⁹ bzw. Pro¹²⁰ der V_L-Region.

3.1.2 Analytik der N-Glycosylierungsstelle

Die vollständige Charakterisierung eines Antikörpers beinhaltet neben der Kenntnis der Aminosäuresequenz, der exakten Masse sowie der Antigenspezifität auch die Bestimmung verschiedener PTMs und insbesondere des Glycosylierungsmotivs in der C_{H2}-Region. Mittels nativer MS konnten bereits mindestens acht verschiedene Feinstrukturen identifiziert werden, was auf unterschiedlich stark glycosylierte Spezies hinweist. Die vollständige Abspaltung der Zucker durch PNGase F und/oder Endo S und anschließende Analytik mittels hochauflösender MALDI-MS bietet eine ausgezeichnete Möglichkeit, einen vertieften Einblick zu bekommen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Es ist zu beachten, dass bei der Messung im positiven Modus und in DHB-Matrix ausschließlich die einfach positiv geladenen Natriumaddukte der einzelnen Oligosaccharide detektiert werden.^[176] Oftmals wird der Matrix Natriumacetat in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt. Im Fall des cPAK konnte durch diese Maßnahme jedoch keine Steigerung der Signalintensität erzielt werden. Die Vollständigkeit der Zuckerabspaltung mittels PNGase F ist vor der Messung mittels SDS-PAGE bestätigt worden. Im unten gezeigten Spektrum ist zu erkennen, dass scheinbar alle möglichen Varianten komplexer fucosylierter und unfucosylierter sowie verschieden stark galactosylierter Zuckerstrukturen am Antikörper vorhanden sind (**Abb. 3.19**). Insgesamt können 17 verschiedene Oligosaccharidspezies detektiert werden.

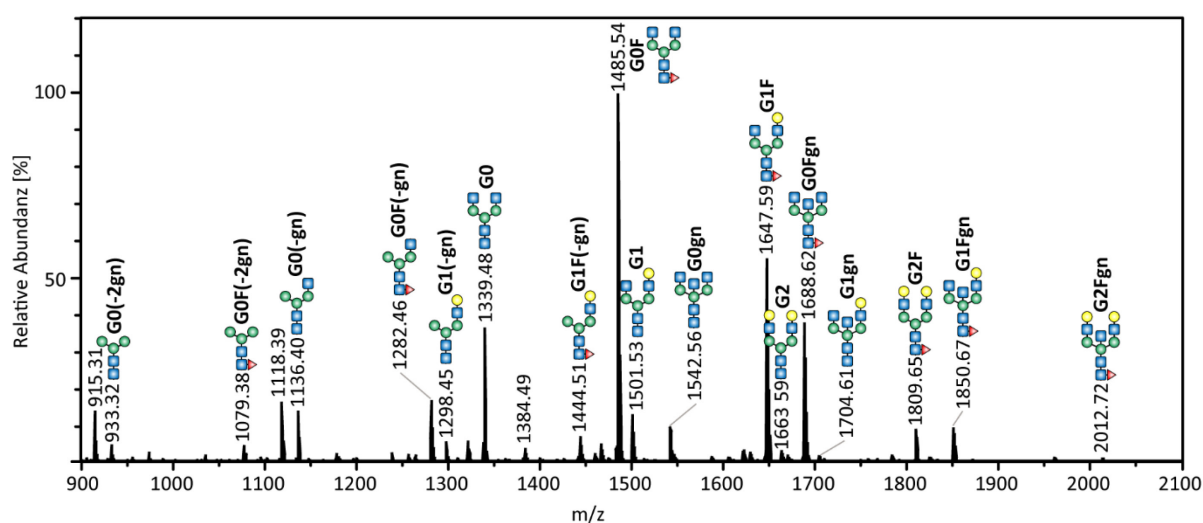


Abbildung 3.19: MALDI-Massenspektrum der mittels PNGase F abgespaltenen N-glycosidisch gebundenen Zucker ($c \approx 10 \mu\text{M}$) in einer 10 mg/mL DHB-Matrix ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50:50 (v/v)).

Die gemessenen m/z -Werte der einfach geladenen Na-Addukte der jeweiligen Glycanstrukturen weichen alle um weniger als 5 ppm von den theoretisch berechneten Massen der Spezies ab. Vergleichende Untersuchungen zur Quantifizierung von Glycanstrukturen mittels HPLC-MS und MALDI-MS verschiedener Forschungsgruppen legen nahe, dass die Intensitäten der einzelnen Spezies im MALDI-Massenspektrum mit der tatsächlichen Häufigkeit der Zucker gut übereinstimmen.^[277-278] Als Voraussetzung dafür gilt, dass die Zuckerspezies sehr ähnlich sind, also wie in diesem Fall ausschließlich sogenannte neutrale Zucker, die als einfach geladene Ionen detektiert werden. Um eine höhere Sicherheit bezüglich der Abundanz der Zucker zu gewährleisten, wurde der Antikörper in vier verschiedenen Ansätzen deglycosyliert, analog aufgearbeitet und unter den gleichen Bedingungen analysiert. Auf Basis der absoluten Intensität der jeweiligen Spezies im MALDI-Massenspektrum sind die relativen Häufigkeiten aller Zuckerstrukturen in der **Abbildung 3.20** als Diagramm zusammengefasst. Wie man bereits beim ersten Blick auf das Spektrum in **Abb. 3.19** gut

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

erkennen kann, handelt es sich bei der G0F-Struktur bei $m/z = 1485,538$ mit über 30 % relativer Abundanz eindeutig um die häufigste Zuckerspezies des Antikörpers. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Untersuchung der Glycosylierungsmuster anderer monoklonaler IgG.^[154, 210]

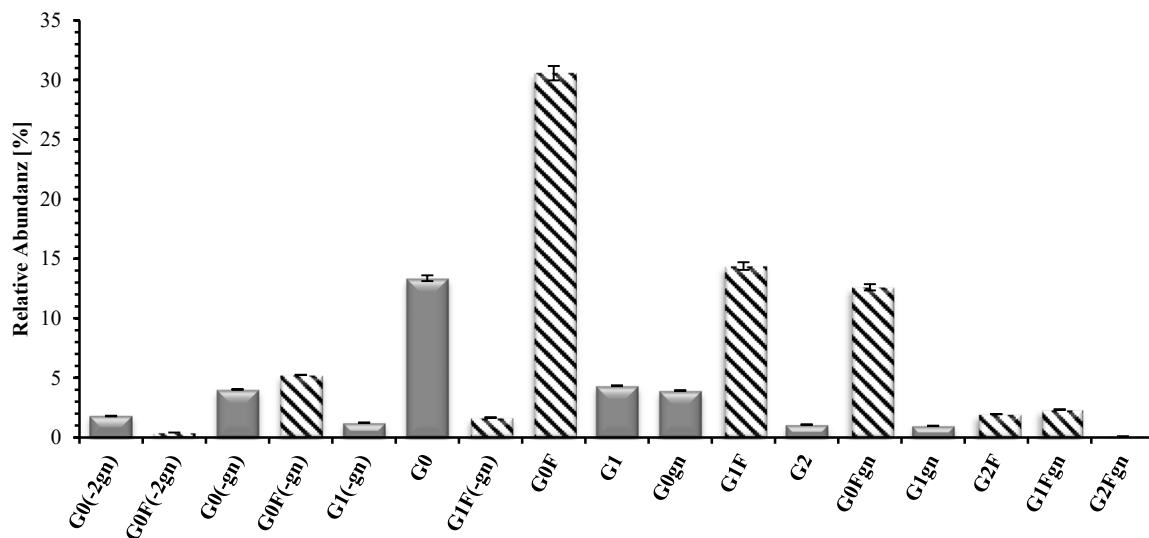


Abbildung 3.20: Relative Abundanz der 17 mittels MALDI-MS detektierten N-glycosidisch am Fc-Teil des cPAK gebundenen Zuckerstrukturen. Die relative Standardabweichung ergibt sich aus den Werten von vier voneinander unabhängigen deglycosylierten AK-Proben. Die Strukturen ohne Kernfucose sind grau hinterlegt, die fucosylierten schwarz-weiß.

Allgemein sind im cPAK die Glycane mit Kernfucosylierung mit rund 70 % der gesamten Zuckerstrukturen deutlich häufiger vertreten als solche ohne α -1,3-Fucose. Knapp 20 % aller Glycane zeichnen sich durch eine *bisecting* GlcNAc-Einheit aus. Die Existenz beider Monomere wirkt sich üblicherweise genau gegensätzlich auf die Effektorfunktion eines Antikörpers aus, wobei die Kernfucosylierung einen deutlich entscheidenderen Einfluss besitzt.^[279-280] Ungefähr 28 % der Glycane tragen einen terminalen Galactoserest, wobei davon wiederum 90 % nur monogalactosyliert sind. Ohne zusätzliches Trennverfahren lassen sich die beiden möglichen G1-Isomere zwar nicht unterscheiden, der Vergleich mit der Literatur lässt allerdings vermuten, dass es sich hauptsächlich um über 1,6-Mannose verknüpfte Spezies handelt.^[281] Grund dafür dürfte wohl die bessere Zugänglichkeit entsprechender Position für die β -Galactosidase sein. Die Signale bei $m/z = 933,32$ bzw. $1136,40$ können der G0(-2gn) bzw. der G0(-gn)-Zuckerstruktur zugeordnet werden. Neben beiden Signalen findet sich ein weiteres Signal deutlich höherer Intensität mit einer um 18 Da niedrigeren Masse, was der Abspaltung von Wasser entspricht. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Existenz dieser Signale zu erklären. Setzt man voraus, dass die G0(-gn)-Struktur Resultat einer Fragmentierung ist, gibt es folgende Möglichkeiten für die Entstehung: Die Abspaltung eines GlcNAc-Monomers aus

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

der G0-Struktur, die der Fucose aus der G0F(-gn)-Struktur oder die der Galactose aus der G1(-gn)-Struktur. In **Abb. 3.21** ist beispielhaft die Abspaltung eines GlcNAc-Monomers aus der G0-Struktur illustriert.

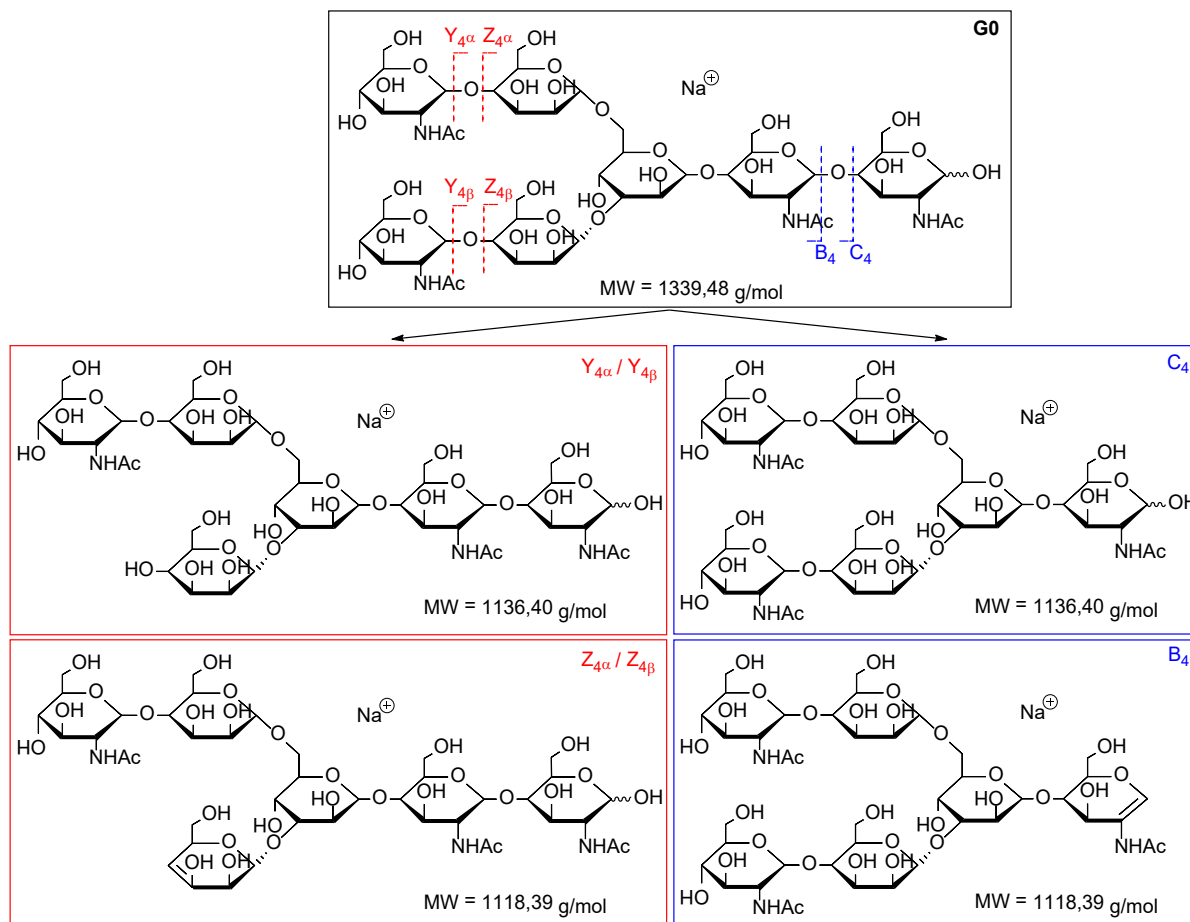


Abbildung 3.21: Bildung verschiedener Fragmente am Beispiel des Natriumaddukts der G0-Struktur durch Abspaltung eines GlcNAc-Rests. Die Spaltung der O-glycosidischen Bindung am nicht-reduzierenden Ende führt zur Generierung des C₄- bzw. des B₄-Fragments (blau). Wird einer der terminalen GlcNAc-Reste am nicht-reduzierenden Ende gespalten, bezeichnet man dies als Y₄- bzw. Z₄-Fragment (rot).

Wird am reduzierenden Ende des Zuckers gespalten, entsteht entweder das B₄-Fragment unter Ausbildung einer Doppelbindung, oder, sofern der Sauerstoff am reduzierenden Ende des Oligosaccharids verbleibt, das C₄-Fragment. Das Y₄- bzw. Z₄-Fragment hingegen entsteht bei Spaltung eines der terminalen GlcNAc-Reste am nicht-reduzierenden Ende. Wird die O-glycosidische Bindung diesseits des resultierenden Fragments gespalten, entsteht entsprechend das B₄- bzw. Z₄-Fragment, welches eine Doppelbindung enthält. Aus den massenspektrometrischen Daten lässt sich allerdings nicht feststellen, welcher der terminalen GlcNAc-Reste abgespalten wird. Ebenso lassen sich die isobaren Fragmente C₄/Y₄ und analog B₄/Z₄ nicht voneinander unterscheiden. Das gleiche Prinzip gilt ebenso für die Abspaltung anderer Zuckermonomere (Gal, Fuc) aus entsprechenden Oligosacchariden und lässt sich auch

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

auf die Bildung der G0(-2gn)-Struktur sowie die fucosylierte Struktur übertragen. Dass sowohl bei der G0(-gn)- als auch bei der G0(-2gn)-Struktur intensive B- bzw. Z-Fragmente auftreten, spricht dafür, dass beide Strukturen zumindest teilweise Resultate einer Fragmentierung innerhalb des Massenspektrometers sind. Abgesehen von der Abspaltung eines GlcNAc-Monomers können sowohl die G0(-gn) als auch die G0(-2gn)-Struktur ebenfalls durch Verlust von Fucose (mit/ohne Wasserverlust) aus der jeweils entsprechenden Struktur generiert werden. Dies könnte eine zusätzliche Erklärung dafür bieten, warum diese Strukturen im MALDI-Spektrum eine vergleichsweise hohe Intensität aufweisen. Die in der CH₂-Domäne gebundenen Glycane dürften einen geringeren Anteil dieser verkürzten Zuckerstrukturen aufweisen, als die relative Intensität der Signale im Massenspektrum vermuten lässt.

Bei einem m/z-Wert von 1384,491 findet sich ein weiteres Signal, das keiner intakten Zuckerstruktur zugeordnet werden kann. Die Massendifferenz zum G0F-Fragment liegt bei 101,05 Da. Es handelt sich hierbei höchstwahrscheinlich um das ^{0,2}A₅-Fragment, das aus der Ringspaltung der innerhalb des ersten GlcNAc am reduzierenden Ende des Zuckers resultiert (**Abb. 3.22**). Die Intensität des Fragments liegt unterhalb von 5 % des Vorläuferions. Dies steht in Übereinstimmung mit Forschungsergebnissen von KAILEMIA *et al.*, laut deren Aussage die Bildung von *Cross-ring*-Fragmenten aus Alkaliaddukten der Oligosaccharide zwar selten ist, aber durchaus auftreten kann.^[182] Das Auftreten des A-Fragments ohne gezielte Stoßexperimente unterstützt die Theorie, dass es sich bei den Signalen für die G0(-gn)- und der G0(-2gn)-Struktur ebenfalls um ein massenspektrometrisches Fragmentierungsphänomen handelt.

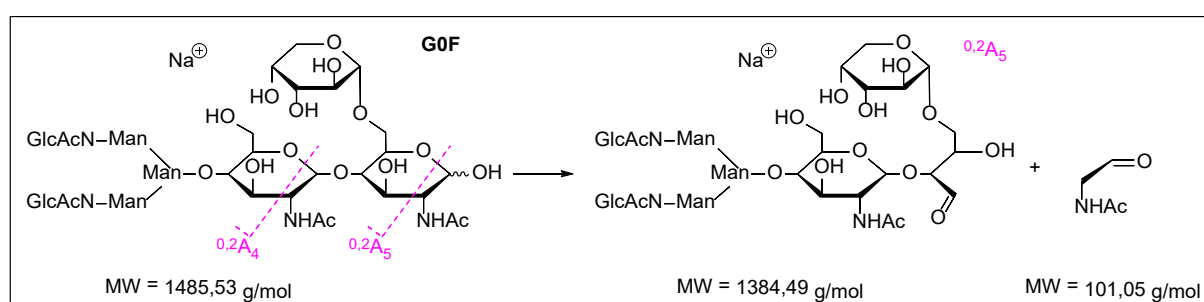


Abbildung 3.22: Bildung des ^{0,2}A₅-Cross-ring-Fragments aus G0F durch Spaltung innerhalb des ersten GlcNAc-Rests am reduzierenden Ende des Oligosaccharids.

Im gesamten Spektrum können keine Glycanstrukturen identifiziert werden, die einen oder mehrere terminale Sialinsäurereste tragen. Dabei wurde gezielt sowohl nach den an Ratten-IgG häufigeren zusätzlich gebundenen NGNA- als auch den seltenere NANA-Monomeren gesucht. Da diese im positiven Modus sehr schwer zu detektieren sind, wurde die Probe ebenfalls im negativen Modus analysiert, wobei THAP als Matrix verwendet wurde.^[175] Hier ließen sich

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

ebenfalls keinerlei sialylierte Glycanstrukturen nachweisen.

Mit Hilfe gezielter CID-Experimente sollen die Fragmentierungswege näher untersucht und nachvollzogen werden. Die Detektion der Ionen nach der Fragmentierung bei einer relativen Kollisionsenergie findet in der Ionenfalle statt, sodass die Massengenauigkeit entsprechend geringer ist. In **Abb. 3.23** sieht man das Tandem-Massenspektrum der abundantesten G0F-Struktur ($m/z = 1485,54$) bei einer relativen Kollisionsenergie von 35 %.

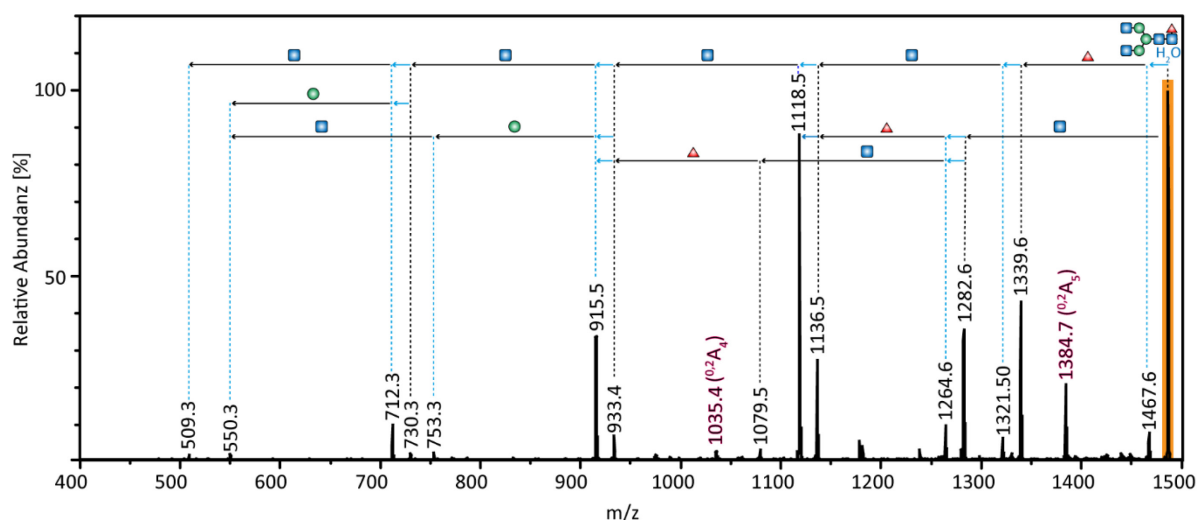


Abbildung 3.23: MALDI-MS/MS-Spektrum der Fragmentierung des intensivsten Ions der G0F-Struktur bei einer relativen KE von 35 %. Die Z- oder B-Fragmente werden durch blaue, die Y- oder C-Fragmente durch schwarze gepunktete Linien markiert. Blaue Pfeile symbolisieren den Verlust von Wasser bzw. den Unterschied zwischen Y/Z-Fragmenten und B/C-Fragmenten.

Bis zum Trisaccharid, entweder bestehend aus drei Mannose-Einheiten ($m/z = 509,3$) oder zwei Mannose- und einer GlcNAc-Einheit ($m/z = 550,3$) können alle Fragmente detektiert werden, die aus einer Spaltung der O-glycosidischen Bindung zwischen den einzelnen Zuckermomeren resultieren. Es können zudem zwei *Cross-ring*-Fragmente identifiziert werden, das bereits beobachtete $^{0,2}A_5$ -Fragment, sowie das $^{0,2}A_4$ -Fragment, das durch Spaltung innerhalb des zweiten GlcNAc-Monomers des Chitobiosekerne gebildet wird. Auch die Abspaltung von Wasser ohne Verlust mindestens eines Zuckermomere aus dem Vorläuferion ist scheinbar nicht vernachlässigbar ($m/z = 1467,7$). Angesichts der vielen Hydroxylgruppen in der Glycanstruktur ist dies durchaus nachvollziehbar. Anhand der MS-Daten lässt sich allerdings nicht feststellen, an welcher Position die Spaltung stattfindet bzw. ob es eine bevorzugte Position gibt. Je kleiner die Fragmente werden, desto abundanter werden diejenigen, bei denen ein Wasserverlust auftritt (entsprechend B- bzw. Z-Fragmente). Bei den Trisaccharidfragmenten werden ausschließlich Signale für die um 18 Da leichteren Strukturen beobachtet. Bei Fragmentierungsexperimenten an den weniger abundanten Spezies G1F

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

($m/z = 1647,592$), G0Fgn ($m/z = 1688,618$) und G1Fgn ($m/z = 1850,671$) lässt sich ebenfalls die sequentielle O-glycosidische Bindungsspaltung zwischen den einzelnen Zuckereinheiten beobachten (Spektren im Anhang). Die Intensitäten der Fragmentensignale lassen keine Aussage zu, ob ein bestimmtes Zuckermonomer bevorzugt vor den anderen abgespalten wird. Bei der G0Fgn- und der G1Fgn-Struktur konnte zudem ebenfalls das $^{0,2}A$ -Cross-ring-Fragment identifiziert werden. Die Deglycosylierung mittels Endo S reduziert die Komplexität des erhaltenen MALDI-Spektrums, da mit der ersten GlcNAc-Einheit auch eventuell gebundene Fucose mit abgespalten wird (Spektrum im Anhang). Wie bereits aus den SDS-Tricin-Gelen und der nativen MS ersichtlich, erfolgt die Zuckerabspaltung nicht vollständig. Die Verteilung der Intensitäten der einzelnen Spezies spiegelt daher die Abundanz der Glycanstrukturen wahrscheinlich weniger gut wieder als beim PNGase F-Verdau. Es lässt sich jedoch zweifelsfrei feststellen, dass der Anteil an terminal galactosylierten Spezies relativ gering ist. Über 80 % der detektierten Glycanstrukturen besitzen keine Galactosereste. Beim Verdau mit PNGase F liegt der bestimmte Wert bei ca. 70 %.

Der Vergleich mit den Daten aus den nativen Massenspektren zeigt, dass deutlich mehr durch unterschiedliche Glycosylierungen hervorgerufene Antikörperfeinstrukturen vorliegen als zunächst vermutet. Zum einen muss berücksichtigt werden, dass die Auflösung im High-Mass Q-ToF-Massenspektrometer wesentlich geringer ist und es dadurch zu Signalüberlagerungen kommt. Zum anderen weisen einige Zuckerstrukturen eine vergleichsweise sehr geringe Abundanz auf. Betrachtet man beispielsweise die G0- und die G1-Struktur, so liegt die Massendifferenz nur bei knapp 16 Da. Im Fall eines 25-fach geladenen Antikörpersignals unterscheiden sich die m/z -Werte nur um 0,6 und können dementsprechend nicht sauber aufgelöst werden. Betrachtet man die Überlegungen, die bezüglich der möglichen Kombination von Glycanstrukturen für die leichteste Antikörperspezies getroffen wurden (**Kap. 3.1.1, Tab. 3.1**) lässt sich folgendes festhalten: Alle in Frage kommenden Oligosaccharide, also die G0, G0(-gn), G0gn, G0F, G0F(-gn), G0F, G1- sowie die G1(-gn)-Struktur, konnten mittels MALDI-MS bestätigt werden. Aufgrund der Tatsache, dass die G0F-Struktur im MALDI-MS die höchste relative Abundanz aufweist, kann man vermuten, dass wiederum die Antikörperspezies, die bei der nativen Analytik das intensivste Signal aufweist (MW = 146.719,2 Da) wahrscheinlich mindestens einen G0F-Rest trägt.

3.1.3 Sequenzierung des Antikörpers auf Proteinebene

Wie in **Kapitel 2.3.3** bereits ausführlich beschrieben, ist der Antikörper von der Firma ALDEVRON auf DNA-Ebene sequenziert und in die entsprechende Aminosäuresequenz für die schwere und leichte Kette übersetzt worden. Mittels der proteolytischen Spaltung des Antikörpers soll die angegebene Sequenz bestätigt sowie das optimale Enzym bzw. die Enzymkombination für eine vollständige Sequenzabdeckung gefunden werden. Dabei sollen die bereits beschriebenen Unterschiede zwischen der laut BRÜGGEMANN *et al.* typischen Sequenz einer γ_{2a} -Kette und der von ALDEVRON angegebenen, die in der Aminosäurezusammensetzung eher einer γ_1 -Kette ähnelt, überprüft werden.^[147] Ein besonderer Fokus liegt hier zum einen auf der Gelenkregion, in der nach allgemeiner Definition eines IgG2a die HC nur durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Zum anderen soll das Glycosylierungsmotiv genauer untersucht werden. Durch Spaltung mittels geeigneter Proteasen können anhand der Glycopeptide eventuell komplementäre Erkenntnisse zu den Resultaten der Zuckeranalytik mittels MALDI-MS (s. **Kap. 3.1.2**) gewonnen werden.

Um die Proteolyse möglichst effizient durchführen zu können, ist der Antikörper zunächst durch eine hohe Harnstoffkonzentration in Lösung denaturiert, die Disulfidbrücken vollständig reduziert und die freien Thiole anschließend mit Iodacetamid irreversibel alkyliert worden. Bei der automatisierten Identifikation der Peptide mittels der Software PEAKS ist daher die Carbamidomethylierung des Cysteins stets als feste Modifikation angegeben worden. Die anschließende enzymatische Spaltung des Antikörpers wurde mit sechs verschiedenen Enzymen vorgenommen, um möglichst 100 %-ige Sequenzabdeckung zu erhalten und so auf eventuelle Sequenzierungsfehler bzw. Mutationen in der Aminosäuresequenz aufmerksam zu werden. Neben der in der Proteinanalytik am häufigsten verwendeten Protease Trypsin (Tr) kamen Chymotrypsin (CT), GluC, LysC, LysN und Thermolysin (TL) zum Einsatz.^[282, 247] Die Abspaltung N-glycosidisch gebundener Zucker erhöht aufgrund der besseren Zugänglichkeit üblicherweise die mittels eines Enzyms erzielte Sequenzabdeckung.^[283] Aus diesem Grund wurde der cPAK in einem zweiten Ansatz vor der Proteolyse mit PNGase F behandelt, um die in der C_H2 -Region gebundenen Glycanstrukturen zu entfernen. Damit ergibt sich für das Enzym GluC eine zusätzliche Schnittstelle, da das Asparagin zu Asparaginsäure ($N \rightarrow D$) modifiziert wurde. Bei Datenbank-bekannten Proteinen ist unter gut gewählten Bedingungen sowohl für die Proteolyse als auch die anschließende Analytik mittels HPLC und hochaufgelöster Tandem-MS eine große Anzahl identifizierter Peptide zu erwarten. Besonders Trypsin, LysC und LysN liefern normalerweise hohe Sequenzabdeckungen im Bereich von 80 - 90 %, da die Spaltung an den basischen Aminosäuren Arg und Lys oft mit der Bildung intensiver y- bzw. b-

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ionenserien in den MS/MS-Spektren einhergeht.^[191]

Im ersten Versuch wurde eine eigens erstellte Datenbank verwendet, die neben der von ALDEVRON bestimmten Sequenz für die LC und HC des cPAK noch die Sequenzen der jeweils verwendeten Enzyme sowie die von Keratin enthält. Das Signalpeptid wurde zwar in der Datenbank mit angegeben, bei der Sequenzabdeckung jedoch vernachlässigt, da es am reifen Protein nicht mehr vorhanden sein sollte. Alle weiteren Einstellungen und Parameter der verschiedenen Suchalgorithmen von PEAKS finden sich in Kapitel 4.5.1 bzw. bei den zugehörigen Datensätzen. Zunächst sollen die Ergebnisse des Trypsinabbaus des glycosylierten und deglycosylierten cPAK näher betrachtet werden. Die leichte Kette des cPAK besitzt 19, die schwere Kette 35 potentielle Schnittstellen nach Lys bzw. Arg. Hinzu kommen potentielle Fehlschnitte sowie *missed cleavages*, die zur Bildung längerer Peptide führen können. Des Weiteren ist zu beachten, dass sehr kurze Peptide oft nicht detektiert werden können. Als Beispiel sei hier der Schnitt am Arg²¹¹ der LC genannt, wobei ein C-terminales, nur drei Aminosäuren langes Peptid entsteht, welches zudem keine basische Aminosäure enthält. Als Parameter für die richtige Zuordnung eines Peptids wird ein $-10\log P$ -Wert > 15 angenommen, was in einer FDR von unter 0,1 % resultiert. Unter diesen Bedingungen lassen sich für die leichte Kette insgesamt 69 Peptide zuordnen, was einer sehr guten Sequenzabdeckung von 96 % entspricht. Für die schwere Kette werden dagegen nur 41 Peptide detektiert und damit eine Sequenzabdeckung von nur 39 % erzielt. Eine Übersicht aller detektierten Peptide befindet sich im Anhang. Es fällt auf, dass der variable Teil der HC nahezu vollständig detektiert werden kann, während für den konstanten Teil (CH1, CH2 und CH3) insgesamt nur vier kurze Sequenzabschnitte gefunden werden. Weder für den allgemein hochkonservierten Bereich um das Glycosylierungsmotiv noch für die Gelenkregion finden sich Übereinstimmungen mit den generierten Massenspektren, obwohl genug potentielle Schnittstellen für Trypsin vorhanden sein sollten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Sequenzierung auf DNA-Ebene fehlerhaft durchgeführt wurde.^[284] Zwar treten gerade bei Antikörpern immer wieder Mutationen in der Sequenz auf, doch sind diese selten so zahlreich, dass über große Bereiche des Antikörpers keine Sequenzabdeckung erzielt werden kann. Des Weiteren handelt es sich bei den Mutationen, die eine Aminosäure in eine andere umwandeln, oftmals um Deamidierungen ($N \rightarrow D$, $Q \rightarrow E$).^[285, 245] Diese werden jedoch vom Spider-Algorithmus von PEAKS abgedeckt und sollten somit kein Problem darstellen. Um Unregelmäßigkeiten beim tryptischen Verdau auszuschließen wurden die Daten mit denen aus der proteolytischen Spaltung des Antikörpers mit den anderen fünf Enzyme CT, GluC, LysC, LysN und TL verglichen. In Abb. 3.24 sind die Sequenzabschnitte, die durch Peptide des jeweiligen

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

enzymatischen Verdaus bestätigt werden konnten, farblich unterlegt.



Abbildung 3.24: Durch Proteolyse mit den sechs verschiedenen Enzymen erzielte Sequenzabdeckung für die ALDEVRON-Sequenz der leichten und schweren Kette. Die gefundenen Peptide sind entsprechend des verwendeten Enzyms farblich unterlegt.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für die leichte Kette liegt die Sequenzabdeckung für alle Enzyme außer GluC und TL über 85 %. Für letzteres ergeben sich aufgrund der AS-Spezifität so viele potentielle Schnittstellen im Antikörper, dass die Entstehung sehr kleiner Peptide wahrscheinlich ist, die wiederum mittels der verwendeten HPLC-MS Methode nicht detektierbar sind. Die Enzyme, die an den basischen Aminosäuren spalten (LysC, LysN, Tr) liefern im Vergleich stets die besseren Ergebnisse.^[286] In jedem Fall kann mit der Kombination der sechs verschiedenen Enzymen eine vollständige Abdeckung für die LC erzielt und die von ALDEVRON angegebene Sequenz somit bestätigt werden. Bei der schweren Kette hingegen ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei dem Abbau mit Trypsin. Die Aminosäuresequenz der V_H-Region Bereich lässt sich vollständig durch proteolytischen Peptide nachvollziehen, während für die konstanten Regionen des cPAK nur wenige Abschnitte ermittelt werden können. Insgesamt liegt die Sequenzabdeckung damit nur bei 60 %.

Mit Hilfe der *De Novo*-Funktion von PEAKS kann man gezielt nach Peptiden suchen, die zwar durch MS/MS-Spektren identifiziert aber in der Datenbank keiner Sequenz zugeordnet werden können. Als Referenz wurde auf die Sequenz eines Ratten-IgG2a zurückgegriffen, dessen konstante Region von BRÜGGEMANN *et al.* charakterisiert worden ist (vgl. **Kap. 2.2.3**).^[147] Beispielhaft wurde mit Hilfe der *De Novo*-Funktion von PEAKS nach Peptiden gesucht, die die Cysteine der Gelenkregion (ECNPCGCT) umfassen, sowie solche, die das Glycosylierungsmotiv enthalten. Dabei wurde durch vorherige Behandlung mit PNGase F Asparagin in Asparaginsäure umgewandelt (NST → DST) um die Suche zu vereinfachen. Für eine höchstwahrscheinlich korrekt zugeordnete Peptidsequenz werden eine lokale Sicherheit der einzelnen Aminosäure des Glycosylierungsmotivs von mindestens 80 % und eine hohe Abdeckung durch y- und/oder b-Ionen vorausgesetzt. Auf dieser Basis konnte der Sequenzabschnitt YWAPEKQSDSTLR als dreifach geladenes Peptid mit einer Abweichung von 4,8 ppm aus dem Trypsin-Abbau identifiziert werden. Des Weiteren findet sich ein ebenfalls dreifach geladenes Peptid der Sequenz WYAPEKKSDSTLVQD mit einer Abweichung von 3,8 ppm in der Probe, die mittels GluC proteolysiert wurde. In dem gleichen Datensatz kann auch das dreifach geladene Peptid YWEPAKKSDSTLRWTD mit einer vergleichsweise großen Abweichung von 10,2 ppm identifiziert werden. Teile der angeblich typischen Gelenkregionssequenz eines IgG2a, die drei carbamidomethylierte Cysteinreste enthalten finden sich im Abbau mittels LysC. Die Masse des zweifach geladenen Peptids VLPRECNPCGC weicht um 1,2 ppm vom theoretischen Wert ab. Als Konsequenz wurde die eigene Datenbank um die bekannte Sequenz der schweren Kette des IgG2a (UniProt-Eintrag Q5M842) erweitert und automatisierte Datenbank- und Mutationssuche wiederholt. Die

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Übersicht über die Ergebnisse zeigt, dass nun für den konstanten Teil der schweren Kette (CH1/CH2/CH3) eine vollständige Sequenzabdeckung durch die Proteolyse mit den sechs Enzymen erzielt werden kann (s. Anhang). Für die hypervariable Region hingegen werden erwartungsgemäß keine Peptide gefunden, einzig drei kurze Sequenzabschnitte, die zu den Fragmentregionen gehören können identifiziert werden. Auf Basis dieser Resultate wurde eine Hybridsequenz erstellt, wobei die Abschnitte, die bei der Suche gegen die von ALDEVRON angegebenen Sequenz nicht gefunden wurden, durch die des Ratten-IgG2a von BRÜGGEMANN *et al.* ersetzt wurden (Abb. 3.25).^[147] Auf diese Weise konnte nun eine vollständige Sequenzabdeckung erzielt werden.

Hybridsequenz HC				AS-Position
MAVLVMLLLCL VTFPSCVLS				(Signalpeptid)
QVQLKESGPG	LVQPSQTLST	TCTVSGFSLN	NYGLSWVRQP	40
PGKGLEWIAA	ISSGGRTFYN	SILKSRLSIS	RDTSQSQVFL	80
KMNSLQTEDT	AIYFCSRDTG	GKYGGPWYWG	QGVMTVSSA	120
ETTAPSVYPL	APGTALKSNS	MVTLGCLVKG	YFPEPVTVTW	160
NSGALSSGVH	TFPAVLQSGI	YTLTSSVTVP	SSTWSSQAVT	200
CNVAHPASST	KVDKKIVPRE	CNPCGCTGSE	VSSVFIFPPK	240
TKDVLTTITLT	PKVTCVVVDI	SQNDPEVRFES	WFIIDDEVHT	280
AQTHAPEKQS	NSTLRVSSEL	PIVHRDWLNG	KTFKCKVNSG	320
AFFPAPIEKSI	SKPEGTPRGP	QVYTMAPPKE	EMTQSQVSIT	360
CMVKGFFYPD	IYTEWKMNQ	PQENYKNTTP	TMDTDGSYFL	400
YSKLNVKKET	WQQGNTFTCS	VLHEGLHNHH	TEKSLSHSPG	440
K				441

Abbildung 3.25: HC-Hybridsequenz aus Abschnitten der ALDEVRON-Sequenz (grün) und der des IgG2a-Proteins Q5M842 aus der Datenbank (gelb). Aminosäuren, in denen beide Sequenzen sich unterscheiden, die also in der Hybridsequenz ausgetauscht wurden, sind rot dargestellt.

Die neue Sequenz ist insgesamt zwei Aminosäuren kürzer als die von ALDEVRON angegebene und unterscheidet sich von ihr in insgesamt 63 Positionen. Statt der vier Cysteinreste in der Gelenkregion werden nur noch drei identifiziert, d.h. dass genau zwei Disulfidbrücken die beiden schweren Ketten miteinander verknüpfen. Dies steht damit in Übereinstimmung mit der anfänglichen Isotypisierung des Antikörpers, die besagt, dass die schweren Ketten dem Typ γ_{2a} zuzuordnen sind. In jedem Fall stimmt die auf DNA-Ebene bestimmte Sequenz des Antikörpers nicht mit der durch die verschiedenen proteolytischen Ansätze bestimmten Aminosäuresequenz überein. Unter Verwendung derselben Enzyme sowie zusätzlich ArgC, AspN und Elastase wurde die Proteolyse mit weiteren zusätzlichen Chargen des Antikörpers wiederholt. Hier wurde durch Auswertung mit Hilfe von PEAKS ebenfalls exakt dieselbe Aminosäuresequenz erhalten. Daraus lässt sich schließen, dass offensichtlich keine Mutation des Antikörpers

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

vorliegt, sondern die Sequenzierung auf DNA-Ebene fehlerhaft war. Da sowohl die DNA-Extraktion aus den für die Antikörperproduktion verwendeten Hybridomzellen als auch die anschließende Sequenzierung extern von der Firma ALDEVRON durchgeführt wurden, können über die Ursache nur Vermutungen angestellt werden. Eine spontane Mutation der Zellen erscheint eher unwahrscheinlich, zumal ausschließlich der konstante Teil des Antikörpers betroffen ist, die leichte Kette wurde fehlerlos analysiert. Im Rahmen der Antikörperproduktion in den B-Zellen ist theoretisch auch ein sogenanntes *Class-Switching* möglich, bei dem durch genetische Rekombination der codierenden DNA-Sequenz bspw. eine Umwandlung einer $\gamma 2a$ in eine $\gamma 1$ -Kette stattfinden kann, während die variablen Teile erhalten bleiben.^[63] Der Vergleich mit bekannten Sequenzen des konstanten Teils von anderen Ratten-Immunglobulinen (IgG1, IgG2b, IgG2c) aus der UniProt-Datenbank zeigt jedoch ebenfalls keine höhere Übereinstimmung mit der von ALDEVRON angegebenen Sequenz. Stattdessen könnte eventuell eine Verunreinigung der Proben zu den falschen Ergebnissen geführt haben. Es lässt sich jedoch nicht abschließend klären, ob bereits die Zellen kontaminiert wurden, eventuell auch falsche Zellen analysiert worden sind, oder die Fehler während des Sequenzierungsprozesses der DNA selbst passiert sind.

In jedem Fall liegt die theoretische aus der neuen Sequenz berechnete Masse des Antikörpers ohne PTMs nun bei 143.429,3 Da und somit um rund 1 kDa niedriger als die ursprünglich angenommene. Diese kann man nun erneut mit dem mittels nativer MS bestimmtem Molekulargewicht des deglycosylierten Antikörpers vergleichen (**Kapitel 3.1.1**). Die leichteste der drei ermittelten cPAK-Spezies liegt bei 143.557,6 Da und somit mit einer Abweichung von knapp 130 Da in deutlich besserer Übereinstimmung als mit der von ALDEVRON angegebenen Sequenz. Die leicht höher liegende Masse könnte selbstverständlich durch unvollständige Desolvatisierung des Antikörpermoleküls im Rahmen der nativen MS begründet sein oder aber mit der Existenz variabler PTMs an den verschiedenen Aminosäuren erklärt werden.

Abgesehen von der als fix angenommenen Carbamidomethylierung an Cysteinresten konnten zahlreiche weitere Modifikationen an anderen Aminosäuren identifiziert werden. Eine Übersicht über alle mittels der PEAKS Datenbanksuche identifizierten Peptide inklusive der jeweiligen Modifikationen findet sich im Anhang, die Gesamtheit aller detektierten PTMs ist in **Tab. 3.2** zusammengefasst. Die Existenz der einzelnen PTMs wurde manuell in den MS/MS-Spektren durch Vergleich der Massendifferenzen zwischen den y- bzw. b-Ionenserien überprüft. Neben der vollständigen Carbamidomethylierung aller Cysteine im Antikörper, lässt sich feststellen, dass auch zahlreiche andere Aminosäuren alkyliert wurden. Die Reaktion hat offenbar stets am N-terminalen Ende eines Peptids stattgefunden. Dies lässt sich dadurch

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

erklären, dass anfänglich ein großer Überschuss an Iodacetamid verwendet wurde und die anschließende Proteolyse in Lösung ohne einen vorherigen Reinigungsschritt stattgefunden hat.^[287] Überschüssiges Iodacetamid kann dann mit der freien Aminogruppe reagieren.

Tabelle 3.2: Übersicht über die PTMs an den Aminosäuren der schweren und leichten Kette sowie Anzahl der MS/MS-Spektren, in denen entsprechende Modifikation detektiert worden ist. Die AS, bei denen die PTM mit einer relativen Ionenintensität von mindestens 5 % ermittelt wurde, sind fett gedruckt.

PTM	Kette	AS-Position	# MS/MS	ΔMW [Da]
Amidierung	LC	193T , 213E	8	- 0,9840
	HC	21T , 94F , 360T , 418T	8	
Ammoniakverlust	LC	34N	3	-17,0265
	HC	263N , 318N , 378N	53	
Carbamidomethylierung @ C	LC	23C , 88C , 134C , 194C , 214C	622	+ 57,0215
	HC	22C , 95C , 146C , 201C , 221C , 224C , 226C , 255C , 315C , 361C , 419C	1882	
Carbamidomethylierung @ X	LC	31K , 37H , 40L , 46L , 148W , 189H , 199K , 207K	48	+ 57,0215
	HC	44G , 64K , 137K , 216L , 242K , 243D , 272F , 273I , 279H , 275V , 287E , 296S , 316K , 317V , 321A , 330I , 332K , 345M , 350E , 364K , 365G , 376K , 377M , 383E , 386K , 409D , 424E	92	
Carbamylierung	LC	184A , 196V	7	+ 43,0058
	HC	44G , 97F , 272F , 276V , 302I , 330I , 339G , 365G , 366F	25	
Deamidierung	LC	50N , 52N , 53N , 124Q , 137N , 138N , 166Q , 190N	41	+ 0,9840
	HC	3Q , 30N , 60N , 83N , 111Q , 139N , 222N , 282Q , 289Q , 291N , 309N , 318N , 341Q , 378N , 380Q , 382Q , 415N , 428N	436	
Dehydratisierung	LC	85T , 161D , 164T , 170D , 192Y , 193T	12	-18,0106
	HC	274D , 298S , 319S , 331S , 336T , 394T , 395D	11	
Dethiomethylierung	LC	4M , 175M	6	-48,0034
	HC	82M , 141M , 345M	10	
Hexose	LC	208S	1	+ 162,0528
	HC	378N	3	
Oxidation	LC	4M , 136M , 175M	37	+ 15,9949
	HC	82M , 114M , 161M , 271W , 345M , 352M , 362M , 373T , 375W , 377M , 392M , 418T , 439T	697	
Pyroglutamat	LC	90Q , 124Q	23	- 17,0266
	HC	1Q , 86Q , 197Q , 289Q , 409E	12	

Als zweithäufigste PTM wurde die Oxidation von Methionin und zweimal auch an Threonin ausgemacht. Allerdings werden auch stets Peptide mit der nicht-oxidierten Variante gefunden, meist sogar in vergleichsweise größerem Umfang. Die Oxidation kann zum einen ein Zeichen von bspw. lagerungsbedingter Degradation oder zum anderen durch die Probenvorbereitung induziert sein. Beides lässt sich jedoch mit der gewählten Methode nicht unterscheiden.^[288] Bei Methionin kann es neben der Oxidation auch zur Dethiomethylierung kommen. Dies geschieht allerdings eher selten und geht meist mit einer vorherigen Oxidation der Aminosäure einher.^[289] Im Fall des Antikörpers können nur fünf entsprechende Peptide detektiert werden. Wesentlich häufiger findet sich dagegen eine Deamidierung, die sowohl Asparagin- als auch Glutaminreste

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

betreffen kann. Bei mindestens 80 % aller Asn-Reste im cPAK werden in den verschiedenen proteolytischen Ansätzen neben Peptiden mit der erwarteten Sequenz mehrere gefunden, bei denen an entsprechender Position nun Asparaginsäure steht. Wie auch bei der Oxidation kann man nicht mit absoluter Sicherheit sagen, ob die Deamidierung vor oder im Laufe der Probenvorbereitung stattgefunden hat.^[290] Im Fall von Asparagin kann in einigen wenigen Fällen auch eine Abspaltung von Ammoniak beobachtet werden. Hier ist die Wahrscheinlichkeit allerdings hoch, dass es sich um ein massenspektrometrisches Fragmentierungsphänomen handelt, da die Intensitäten der PTM in den MS/MS-Spektren jeweils sehr gering sind. Ähnlich verhält es sich mit der Dehydratisierung, die an einigen Aminosäuren mit Hydroxyfunktion (Ser, Thr, Asp) nachgewiesen werden kann.^[291] Sofern sie sich am N-terminalen Ende eines Peptids befinden, können sowohl Glutamin als auch Glutaminsäure unter bestimmten Bedingungen zyklisieren. Im Vergleich ist eine Deamidierung scheinbar jedoch wesentlich wahrscheinlicher. Carbamylierung werden ausschließlich am N-terminalen Ende verschiedener Peptide detektiert. Man kann davon ausgehen, dass es sich hier ebenfalls um eine nachträglich durch die Probenvorbereitung eingeführte PTM handelt. So ist literaturbekannt, dass aus Harnstoff durch spontane Disproportionierung Isocyanat gebildet werden kann, das wiederum mit freien Aminogruppen reagiert.^[292] Zur Denaturierung des Antikörpers ist zu Beginn eine hohe Harnstoffkonzentration verwendet worden und die Probelösung vor der Proteolyse nur stark verdünnt, der Harnstoff aber nicht extra abgetrennt worden, sodass eine nachträgliche Reaktion durchaus vorstellbar ist.

Bei der Suche nach Zuckerstrukturen können nur zwei einzelne Hexoseeinheiten, eine O-glycosidisch an Serin gebundene in der leichten und eine N-glycosidisch an Asparagin gebundene in der schweren Kette, identifiziert werden. Ob es sich hierbei tatsächlich um eine *in vivo* eingeführte enzymatische Glycosylierung oder eine Glycierung handelt, kann nicht unterschieden werden. Zudem werden die Modifikationen auch nur in jeweils einem Ansatz eines Enzyms gefunden: der Hexoserest in der LC bei Proteolyse mit LysN und in der HC bei Proteolyse mit CT, sowohl mit als auch ohne Behandlung von PNGase F. Glycopeptide, welche die hochkonservierte Sequenz um das Motiv am Asp²⁹¹ enthalten, werden in der vorliegenden Arbeit von PEAKS hingegen gar nicht identifiziert. Allgemein findet die Sequenzabdeckung hier beinahe ausschließlich durch mittels PNGase F deglycosylierte Peptide statt, sodass als PTM stets eine Deamidierung angenommen wird. Grund dafür könnte die Vielzahl verschiedener Glycanstrukturen sein, die an dieser Position offenbar auftreten, wie die Ergebnisse mittels MALDI-MS (vgl. **Kap. 3.1.2**) vermuten lassen. So könnte zum einen die Intensität der einzelnen verschiedenen glycosylierten Peptide sehr gering sein, zum anderen

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

könnte eine mögliche Fragmentierung der Zucker die Interpretation mit dem automatisierten Algorithmus erschweren. Aus diesem Grund wurde auf Basis der in der deglycosylierten Form detektierten Peptide mit Hilfe der Software Xcalibur manuell nach den entsprechenden Glycopeptiden gesucht (s. nächster Abschnitt). Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit denen der nativen MS lässt sich festhalten, dass auf Peptidebene deutlich mehr PTMs detektiert werden können. In den nativen MS-Spektren ist nur eine einzige scharfe Ladungsserie für die LC zu finden, deren Signale zudem sehr schmal sind, sodass man nicht zwingend definierte Modifikationen an bestimmten Aminosäuren vermuten würde. Die auf Peptidebene detektierten PTMs sind also wahrscheinlich tatsächlich hauptsächlich auf die Probenvorbereitung zurückzuführen bzw. nur zu so einem geringen Prozentsatz vertreten, dass sie bei der Analytik der vollständigen LC nicht signifikant sind. Amidierungen bzw. Deamidierungen sind aufgrund der geringen Massendifferenz und der natürlichen Peakbreite von vornherein nicht nachweisbar. Andere PTMs wie die Oxidation von Methionin oder die Bildung von Pyrovat werden auch stets nie bei allen Peptiden gefunden, sodass diese bei der Analytik mittels nativer MS aufgrund der niedrigen Abundanz erst recht untergehen dürften. Bei der schweren Kette verhält sich die Situation sehr ähnlich. Allerdings wurden im Antikörper hier nach Deglycosylierung mit PNGase F eindeutig noch drei Feinstrukturen identifiziert. Neben der Vermutung, dass es sich um eine Cysteinylierung handeln könnte, besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass eine Kombination aus leichteren PTMs zu den Feinstrukturen mit erhöhter Masse führt. In Frage kommen dafür nur Modifikationen, die nicht zwingend nachträglich eingeführt wurden, in diesem Fall also die Oxidation von Methionin, Thr oder Trp.

Glycopeptide

Zur besseren Übersicht über eventuell detektierbare Glycopeptide wurden zunächst auf Basis der spezifischen Schnittstellen für jedes Enzym alle potentiellen Peptide mit bis zu zwei *missed cleavages* erzeugt. Die Suche nach der Masse der entsprechenden Spezies wird anschließend in jedem Chromatogramm bzw. den zugehörigen Spektren manuell durchgeführt. Theoretisch sind pro Enzym insgesamt sechs verschiedene Peptide möglich, die das Glycosylierungsmotiv enthalten. Zunächst ist in den mit PNGase F behandelten Ansätzen nach den entsprechend deglycosylierten Peptiden mit dem Motiv -DST- gesucht worden. Dies bietet eine gute Übersicht über die tatsächlichen Schnittstellen in der Proteolyse mit den einzelnen Enzymen. Des Weiteren geben die Retentionszeit im Chromatogramm sowie die Ladungszustände, in denen die Peptide vorliegen, gute Anhaltspunkte für die folgend Suche nach den verschiedenen

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

jeweils glycosylierten Spezies. Im Fall der Proteolyse des cPAK mit GluC wird das deamidierte Asn²⁹¹ nicht als potentielle Schnittstelle berücksichtigt, da diese im glycosylierten Peptid entsprechend nicht auftritt. In der folgenden **Tabelle 3.3** sind die entsprechenden Glycopeptide zusammengefasst, die nach Proteolyse mit dem jeweiligen Enzym detektiert werden können. Für eine korrekte Identifikation wurde eine geringere Abweichung als 5 ppm von der theoretischen Masse vorausgesetzt. Die Identifikation mindestens zweier Ladungszustände eines Peptids mit gleicher Retentionszeit im Chromatogramm bietet zusätzliche Sicherheit. Eine Zusammenstellung über die exakten Massen bzw. die m/z-Werte der einzelnen Spezies sowie die zugehörigen Abweichungen befindet sich im Anhang.

Tabelle 3.3: Übersicht über detektierte deglycosylierte Peptide des proteolysierten cPAK, die das Glycosylierungsmotiv enthalten. Neben dem Molekulargewicht sind die *missed cleavages* (m.c.), die chromatographische Retentionszeit (*retention time*, r.t.) sowie die detektierten Ladungszustände (z) angegeben.

Peptid	m.c.	MW [Da]	r.t. [min]	z
Chymotrypsin				
* keine Peptide gefunden				
GluC				
KQSNSTLRVSE	0	1335,6630	14,2	2/3
VHTAQTHAPEKQSNSTLRVSE	1	2407,1727	15,5	3/4/5
VEVHTAQTHAPEKQSNSTLRVSE	2	2635,2837	17,5	3/4/5
LysC				
QSNSTLRVSELPIVHRDWLNGK	0	2636,3670	31,0	2/3/4/5
LysN				
KQSNSTLRVSELPIVHRDWLNG	0	2636,3670	31,3	4/5
KQSNSTLRVSELPIVHRDWLNGKTF	1	3012,5780	31,9	5
KQSNSTLRVSELPIVHRDWLNGKTFKC	2	3243,6822	27,3	4/5
Thermolysin				
IDDVEVHTAQTHAPEKQSNST	1	2307,0615	15,9	3/4
AQTHAPEKQSNSTLRVSELP	2	2280,1346	20,3	3/4
FIDDVEVHTAQTHAPEKQSNST	2	2454,1299	20,5	3/4
Trypsin				
FSWFIDDVEVHTAQTHAPEKQSNSTLR	1	3143,4948	32,5	4/5

Obwohl alle mittels CT theoretisch gespaltenen Peptide bei entsprechender Ladung im passenden Massenbereich vorliegen würden, können keine Spezies im Chromatogramm bzw. Massenspektrum gefunden werden. Man könnte vermuten, dass ein Grund dafür ist, dass einige der theoretischen Peptide einen recht geringen Anteil von weniger als 13 Mol-% an basischen AS enthalten, die für die effektive Ionisation erforderlich sind. Die Peptide mit mindestens einer ausgelassenen Schnittstelle, bei denen der Anteil höher liegt, sind wiederum recht lang (> 35 AS), was eventuell die Detektion verhindert. Des Weiteren ist auch eine ineffektive Spaltung durch das Enzym als mögliche Ursache in Betracht zu ziehen. Für GluC hingegen

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

werden insgesamt drei Peptide gefunden, das vollständig geschnittene in den Ladungszuständen 2+ und 3+, sowie ein einfach und zweifach fehlgeschnittenes Peptid in den Ladungszuständen 3+ - 5+. Die Spaltung am Glu²⁹⁹ scheint unproblematisch und effektiv zu funktionieren, sodass die anderen fehlgeschnittenen Peptide entsprechend nicht auftauchen. In der mittels LysC proteolysierten Probe wird mit einer hohen Intensität und in vier Ladungszuständen ausschließlich das vollständig geschnittene Peptid detektiert. Bei Proteolyse mittels LysN finden sich hingegen zusätzlich noch ein einfach und ein zweifach ungeschnittenes Peptid. Laut Literatur besitzt LysC eine leicht höhere Spezifität bzw. geringere Anfälligkeit für Fehlschnitte als LysN, was eine Erklärung für diese Beobachtung sein könnte.^[293] Thermolysin spaltet scheinbar effektiv vor Leu²⁹⁴ direkt nach dem Glycosylierungsmotiv -NST-, wobei nur das entsprechende Peptid mit einer bzw. zwei *missed cleavages* in den Ladungszuständen 3+ und 4+ gefunden werden kann. Des Weiteren kann noch die zweifach fehlgeschnittene Peptidspezies nachgewiesen werden, bei dem das Glycosylierungsmotiv in der Peptidmitte liegt. Die detektierten Peptide passen gut zu der Beobachtung, dass Thermolysin unter den unpolaren Aminosäuren vor allem bevorzugt vor Phenylalanin und Leucin bzw. Isoleucin spaltet.^[294] Aus der proteolytischen Spaltung mit Trypsin kann lediglich das einfach fehlgeschnittene Peptid FSWFIDDVEVHTAQTHAPEKQSNSTLR als vier- und fünffach geladenes Ion nachgewiesen werden. Da die Spaltung mit Trypsin üblicherweise mit hoher Spezifität und Ausbeute abläuft, ist es wahrscheinlich, dass auch das vollständig geschnittene Peptid entsteht. Da dieses jedoch nur sieben Aminosäuren lang und zudem sehr polar ist, kann man vermuten, dass es bei der massenspektrometrischen Analytik nicht erfasst wird.

Auf Basis dieser Ergebnisse wird in den nicht-deglycosylierten proteolysierten Proben gezielt nach den entsprechenden Peptiden mit Glycanstruktur gesucht. Es sind dabei alle möglichen Glycanstrukturen mit und ohne *bisecting* GlcNAc, Fucose, verschiedenem Galactosylierungsgrad (G0/G1/G2) sowie terminaler Sialinsäure (NANA/NGNA) berücksichtigt worden. Die Ergebnisse sind in **Tab. 3.4** zusammengefasst, eine detaillierte Aufstellung befindet sich im Anhang. Allgemein lässt sich feststellen, dass die Glycopeptide im Vergleich zu den deglycosylierten durchschnittliche eine Minute früher eluieren. Grund dafür ist die erhöhte Polarität durch die Zuckerstrukturen. Innerhalb eines Peptids können zwischen den unterschiedlichen Glycosylierungen keine Unterschiede in den Retentionszeiten festgestellt werden. Bei der Spaltung mit GluC kann anders als beim deglycosylierten Antikörper kein Signal für das korrekt geschnittene Peptid gefunden werden. Eventuell wird die Zugänglichkeit der Spaltungsstelle für GluC durch die gebundene Glycanstruktur behindert. Bei dem einfach fehlgeschnittenen Peptid können hingegen insgesamt 16 verschiedene

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zuckermotive eindeutig identifiziert werden. Abgesehen von der G2Fgn-Struktur können von jeder Spezies auch mindestens zwei Ladungszustände (hauptsächlich 4+ und 5+) identifiziert werden. Dies bietet eine zusätzliche Sicherheit, da aufgrund der relativ geringen Abundanz der Glycopeptide im Vergleich zu den übrigen Peptiden keine MS/MS-Spektren aufgenommen worden sind.

Tabelle 3.4: Übersicht über die detektierten Glycanstrukturen in den jeweiligen Glycopeptiden der verschiedenen proteolytischen Ansätze des cPAK.

Zucker	G0 (-gn)	G1 (-gn)	G0	G1	G2	G0 gn	G1 gn	G0F (-gn)	G1F (-gn)	G0F	G1F	G2F	G0F gn	G1F gn	G2F gn	G1F Sia
GluC																
VHTAQTHAPEKQSNSTLRVSE (1x m.c.) r.t. = 13,1 min																
	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
z	4/5	4/5	3/4/5	3/4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	3/4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	5	4/5
VEVHTAQTHAPEKQSNSTLRVSE (2x m.c.) r.t. = 16,0 min																
	×	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	×
z		5	4/5	4/5	4/5	4/5		4/5	5	4/5	4/5	5	4/5	4/5		
LysC																
QSNSTLRVSELPVHRDWLNGK (0x m.c.) r.t. = 29,3 min																
	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
z	4/5	4/5	3/4/5	4/5	4/5	4/5	5	4/5	4/5	3/4/5	3/4/5	4/5	4/5	4/5	5	5
LysN																
KQSNSTLRVSELPVHRDWLNG (0x m.c.) r.t. = 29,9 min																
	×	×	✓	×	×	×	×	×	×	✓	×	×	×	×	×	×
z			5							4/5						
Thermolysin																
IDDVEVHTAQTHAPEKQSNST (1x m.c.) r.t. = 14,9 min																
	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	×	×
z	4	4	3/4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			
FIDDVEVHTAQTHAPEKQSNST (2x m.c.) r.t. = 19,7 min																
	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	×
z	4	4	3/4/5	3/4/5	4	4	4	4	4	3/4/5	3/4/5	4	3/4/5	4		
Trypsin																
FSWFIDDVEVHTAQTHAPEKQSNSTLR (1x m.c.) r.t. = 31,7 min																
	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×
z	5	5	4/5	5	5	4/5	4/5	5	5	4/5	5	5	4/5	4/5	5	

Anders als bei der Analytik der durch Behandlung mit PNGase F freigesetzten Zucker mittels MALDI-MS kann weder ein Signal für eine G0(-2gn) noch für die G0F(-2gn)-Spezies identifiziert werden (vgl. **Kap. 3.1.2**). Dies unterstützt die bereits aufgestellte These, dass es sich bei entsprechendem Signal im MALDI-MS-Spektrum um ein Fragmentierungsphänomen handelt, also die Abspaltung eines GlcNAc-Rests aus einer der entsprechenden komplexeren Struktur, die mitunter mit dem Verlust von Wasser einhergeht. Andererseits wurde dafür ein Peptid gefunden, das eine einfach mit NGNA modifizierte G1F-Struktur (G1FSia) trägt, welche unter den abgespaltenen freien Zucker nicht detektiert werden konnte. Als Begründung dafür kann man anführen, dass sialylierte Spezies besonders im positiven Modus mittels MALDI-MS

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

schwer ionisierbar sind, sofern vorher keine Modifikation bspw. durch Methylierung der Säurefunktionen eingeführt wurde.^[175] Hinzu kommt, dass die G1FSia-Struktur, legt man die relative Intensität des entsprechenden Glycopeptids im Massenspektrum zu Grunde, im Vergleich zu den anderen Zuckern eine geringe Abundanz aufweist (< 1 % im Vergleich zur G0F-Struktur). Vergleicht man die relativen Intensitäten aller vierfach geladenen Glycopeptidspezies des GluC-Abbaus untereinander, so scheint die G0F-Struktur mit Abstand die häufigste Zuckervariante innerhalb des Antikörpers zu sein, gefolgt von der G0-, der G1F und G0Fgn-Struktur, deren Signale ungefähr halb so abundant sind. Dieses Resultat steht wiederum in guter Übereinstimmung mit den mittels MALDI-MS erhaltenen Ergebnissen bezüglich der relativen Verteilung (vgl. **Kap. 3.1.2**). Außer bei dem einfach fehlgeschnittenen GluC-Peptid können nur im LysC-Verdau ebenfalls die 16 verschiedenen Glycopeptide zweifelsfrei nachgewiesen werden. Es handelt sich hier um das vollständig geschnittene Peptid, wie es auch in der deglycosylierten Form detektiert werden kann. Im Gegensatz dazu scheint die Proteolyse mit LysN weniger gut funktioniert zu haben. So können zwei unterschiedliche Glycopeptide, die die vergleichsweise abundante G0- bzw. die G0F-Struktur enthalten, detektiert werden. Fehlgeschnittene Glycopeptide, wie nach der Behandlung mit PNGase F, werden gar nicht gefunden. Nach Proteolyse mit Thermolysin konnten zwei Glycopeptide identifiziert werden, die 13 bzw. 14 verschiedene Zuckerstrukturen tragen. Auch wenn oftmals nur ein einziger Ladungszustand der entsprechenden Spezies vorliegt, ist die Zuordnung aufgrund der geringen Abweichung und untereinander übereinstimmender Retentionszeit im Chromatogramm als sicher anzunehmen. Die sialylierte G1F-Struktur kann nicht nachgewiesen werden, ebenso wie die fucosylierten zwei- bzw. ein- und zweifach galactosylierten Glycane mit einem *bisecting* GlcNAc-Rest. Im Fall des durch Spaltung mit Trypsin erzeugten einfach fehlgeschnittenen Peptids wird einzig die G1FSia-Struktur nicht detektiert.

Allgemein lässt sich festhalten, dass mit der Auswahl der Enzyme ausreichend Glycopeptide erzeugt und mittels HPLC-ESI-MS/MS detektiert werden können, um die mittels MALDI-MS gefundenen Zucker zu bestätigen und zusätzlich noch die einfach mit NGNA-modifizierte G1F-Struktur nachzuweisen. Es können keine exakten Angaben über den prozentualen Anteil dieser Struktur für die Gesamtmenge der N-glycosidisch gebundenen Zucker des cPAK gemacht werden, man kann jedoch vermuten, dass er unterhalb von 1 % liegt. Dafür spricht neben der niedrigen relativen Intensität im Massenspektrum der Glycopeptide von GluC und LysN auch die Tatsache, dass bspw. bei Trypsin alle anderen Glycane bis auf diese Struktur nachgewiesen werden können. Es ist bekannt, dass an Ratten-Antikörpern terminal neben NGNA- auch NANA-Reste gebunden sein können, hier können jedoch keine Hinweise auf die Existenz

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

letzterer gefunden werden. Vergleiche mit der Literatur legen zudem nahe, dass der Anteil der NANA-modifizierten Zucker, so vorhanden, um ein Zehntel niedriger liegt als die der NGNA-Reste, die an einem repräsentativ deglycosylierten Ratten-Antikörper nur 2 % der Gesamtmenge der Zucker ausmachen.^[154] Rückschlüsse auf die prozentuale Verteilung aller detektierten Glycanstrukturen ist deutlich schwieriger als bei der Analytik mit MALDI-MS, da fast immer mehrere Ladungszustände berücksichtigt werden müssen. Man kann allerdings mit großer Sicherheit behaupten, dass es sich bei der G0F-Struktur wohl um das häufigste Motiv handelt. So wird ein entsprechendes Glycopeptid in jeden proteolytischen Ansatz meist als Serie von drei Ladungszuständen gefunden und es kann ein entsprechend intensives Signal im Chromatogramm für den entsprechenden m/z-Wert aus dem totalen Ionenstrom (*total ion current*, TIC) isoliert werden.

3.2 Markierung des Antikörpers an den Zuckerstrukturen

Für eventuelle zukünftige Anwendungen wurde eine Methode gesucht, den Antikörper spezifisch und vor allem unter vollständigem Erhalt seiner nativen Struktur und der antigenbindenden Eigenschaften zu markieren. Am weitesten verbreitet sind dazu Konjugationen mit Farbstoffen oder Enzymen.^[295-296] Fluoreszenzmarkierte Antikörper besitzen bspw. ein sehr weites Einsatzgebiet im Bereich immunhistochemischer Methoden und zeichnen sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus.^[297] In der praktischen Anwendung kann sich allerdings Hintergrundfluoreszenz, z. B. ausgelöst durch Autofluoreszenz von Zellkompartimenten, bei Analytik von Zellen oder Gewebeproben als problematisch erweisen.^[298] Des Weiteren sind Fluoreszenzfarbstoffe sehr lichtempfindlich, was die Handhabung im Labor erschwert.^[299] Als vielversprechende Alternative hat sich gerade in den letzten Jahren die Markierung mit komplexierten Metallen erwiesen.^[300] In der Arbeitsgruppe von N. JAKUBOWSKI wurden dazu erfolgreich zwei Methoden zur kovalenten Knüpfung DOTA-basierter Lanthanoidkomplexe an monoklonale Antikörper etabliert.^[301, 229] Hierbei können entweder die freien Aminogruppen des Antikörpers über eine Isothiofunktionalität am Metallkomplex adressiert oder aber freie Thiolgruppen mittels Maleinimid modifiziert werden.^[228] Bei letzterer Variante müssen zunächst die Disulfidbrücken durch Reduktion zugänglich gemacht werden, was zu einem gewissen Grad mit einer Spaltung, also einer Denaturierung des Antikörpers, und damit einem Verlust an der Funktionalität einhergeht. Die Knüpfung an die freien Aminofunktionen hat wiederum den Nachteil, dass die Reaktion auch

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

am N-terminalen Ende der LC und HC oder Lysinresten im Fab-Teil stattfinden und somit das Bindungsepitop stören kann. Der Vorteil beider Methoden liegt in der Detektion mittels ICP-MS, mit der nicht nur eine hohe Empfindlichkeit und geringe Interferenz erzielt werden kann, sondern bei bekanntem Markierungsgrad auch eine absolute Quantifizierung möglich ist. Im Fall des cPAK hätte eine Metallmarkierung noch einen weiteren Anreiz: So wäre bei der Analytik von Cisplatin-behandelten Zellen oder Geweben die simultane Detektion des Gesamtplatins der Probe im Vergleich zur platinieren DNA, die wiederum durch den Antikörper markiert wird, möglich. Damit könnte man eventuell abschätzen, wieviel des Zytostatikums tatsächlich in den Zellkern diffundiert und wieviel insgesamt im Cytosol vorhanden ist und dort bspw. durch schwefelhaltige Proteine wie Glutathion gebunden wird. Dies ist besonders deshalb interessant, da vermutet wird, dass dieser Abfangmechanismus einen erheblichen Einfluss auf die Resistenz von Zellen gegen die Behandlung mit Cisplatin besitzt.^[28-29]

Für die Markierung des Antikörpers muss zunächst eine milde Methode gefunden werden, die möglichst wenig in die native Struktur des Antikörpers eingreift und die antigenbindenden Eigenschaften nicht beeinflusst. Die in **Kapitel 2.4.1** angesprochene enzymatische Einführung einer reaktiven Gruppe an den Zuckerresten des Antikörpers scheint zu diesem Zweck ideal (**Abb. 3.26**).

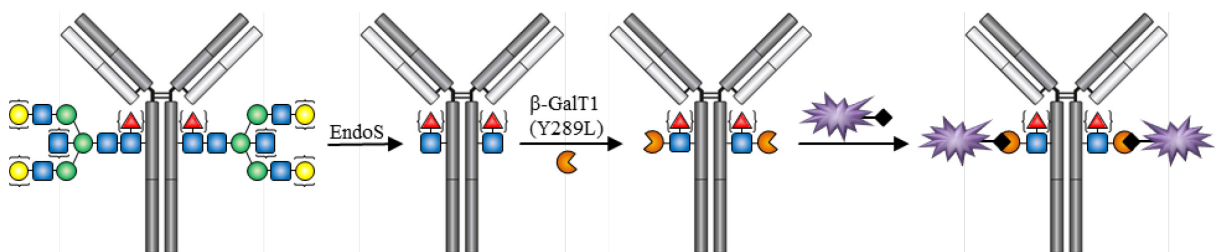


Abbildung 3.26: Schema der Markierungsreaktion an den N-glycosidischen Zuckerresten des Antikörpers. Nachdem die Zucker bis auf einen (evtl. fucosylierten) GlcNAc-Rest abgespalten sind, wird die Azid-modifizierte Galactose enzymatisch eingeführt. Das Label, das entsprechend mit der komplementären Alkinfunktion ausgestattet ist, kann in einer einfachen katalysatorfreien Cycloaddition mit dem Azid verknüpft werden.

Für die Verwendung des mutierten Enzyms β -GalT1 müssen freie reduzierende GlcNAc-Reste vorliegen, die entsprechend durch die Galactose mit Azidfunktion modifiziert werden können. Die hierfür notwendige Teildeglycosylierung, also die Abspaltung der verzweigten Glycanstrukturen bis auf ein freies GlcNAc, lässt sich beispielsweise durch das Enzym Endo S realisieren. So konnte bereits in **Kapitel 3.1.1** gezeigt werden, dass hier eine Spaltung innerhalb des Chitobiosekerne stattfindet, die sich schnell und einfach mittels Tricin-SDS-PAGE, aber auch mittels nativer MS nachweisen lässt. Als nächstes kann dann mittels β -GalT1 eine Azid-

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

modifizierte Galactose an das GlcNAc gebunden werden. Im letzten Schritt wird das gewünschte Label, das eine gespannte Alkinfunktion trägt, mittels 1,3-dipolarer Cycloaddition über das Azid kovalent an den Antikörper geknüpft.

Das Markierungskonzept ist zunächst mit dem Fluoreszenzmarker ICC-DIBO, der von F. ABENDROTH aus der Arbeitsgruppe SEITZ bereitgestellt wurde, überprüft worden. Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs ermöglicht eine schnelle und einfache Analytik mittels PAGE und entsprechendes Auslesen des Fluoreszenzsignals mit einem Imaging-Gerät (Kodak Image Station). Zur Einführung des Azids ist der kommerziell erhältliche Click-iT® O-GlcNAc Enzymatic Labeling System-Kit verwendet worden, der sowohl das Enzym wie auch das UDP-GalNAz als enthält. Die Abspaltung des UDP-Rests vom GalNAz dient als Energielieferant zur Knüpfung der 1,4-glycosidischen Bindung zum GlcNAc (vgl. **Kapitel 2.4.1**, **Abb. 2.16**). Der verwendete HEPES- und Tris-Puffer sowie die Manganchloridlösung sind selbst hergestellt worden um zu vermeiden, dass in der mitgelieferten Lösung enthaltene Zusätze, wie ionische oder nicht-ionische Detergenzien, eventuell die native Struktur des Antikörpers zerstören. Als Positivkontrolle wurde das Protein α -Crystallin mitgeführt, das in seiner Sequenz genau ein O-glycosidisch an Serin gebundenes GlcNAc enthält. Um eine unspezifische Bindung an den Antikörper auszuschließen, wurde der Antikörper unter denselben Bedingungen mit den Reagenzien jedoch ohne Zusatz des Enzyms inkubiert. Die Reaktion wurde wie in der Vorschrift angegeben bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Die anschließende *Huisgen*-Reaktion mit dem ICC-DIBO erfolgte ohne weiteren Reinigungsschritt bei Raumtemperatur (**Abb. 3.27**).

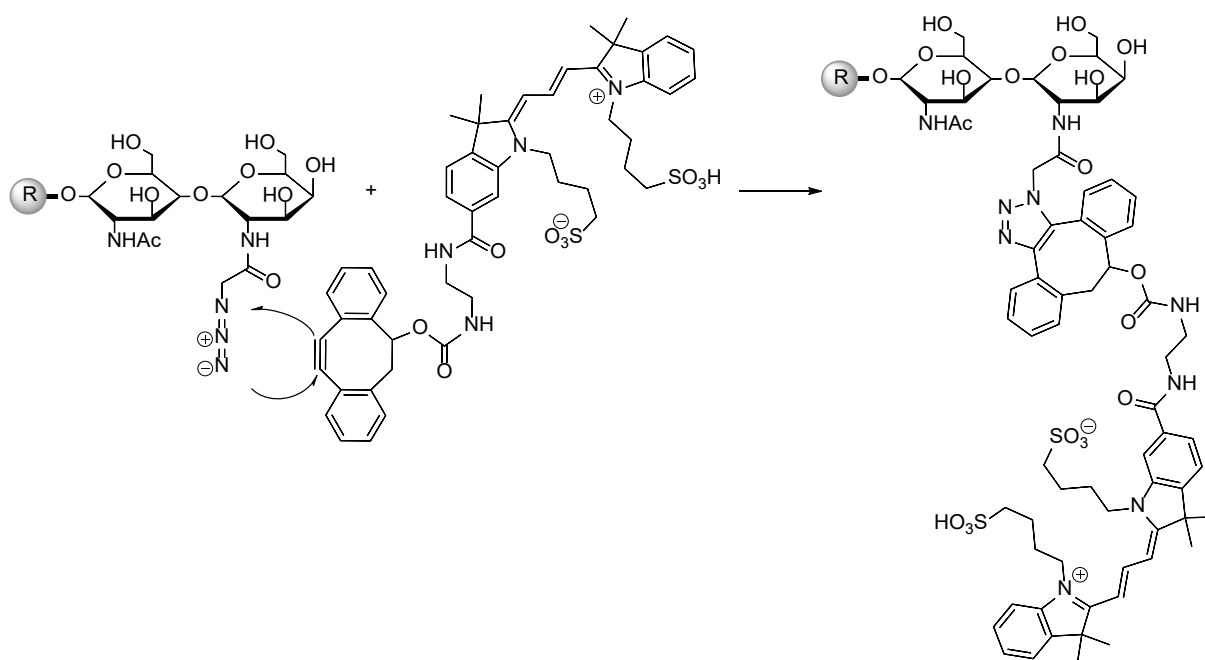


Abbildung 3.27: Kupferfreie 1,3-dipolare Cycloaddition des antikörpergebundenen Galactosylazids an die gespannte Alkinfunktion des Fluoreszenzfarbstoffs ICC-DIBO.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Da der Farbstoff in DMSO gelöst war und eine hohe Konzentration eventuell eine Denaturierung des Antikörpers zur Folge haben könnte, wurde die Endkonzentration des organischen Lösungsmittels durch Verdünnung auf unter 2 Vol-% reduziert. Nach der Reaktion wurden die Reaktionsmischungen mittels reduzierender Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und die Gelbanden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Anregung und das Auslesen des Fluoreszenzsignals erfolgten auf demselben Gel (**Abb. 3.28**). Auf dem linken mit Silber gefärbten Gel sind für alle Antikörperproben neben der Bande für die leichte Kette bei ca. 25 kDa zwei Banden für die schwere Kette des Antikörpers bei rund 50 kDa erkennbar. Wie bereits in **Kap. 3.1.1** diskutiert wurde, verläuft die Deglycosylierung mit Endo S nicht quantitativ, sodass die glycosylierte HC stets auch nachweisbar ist.

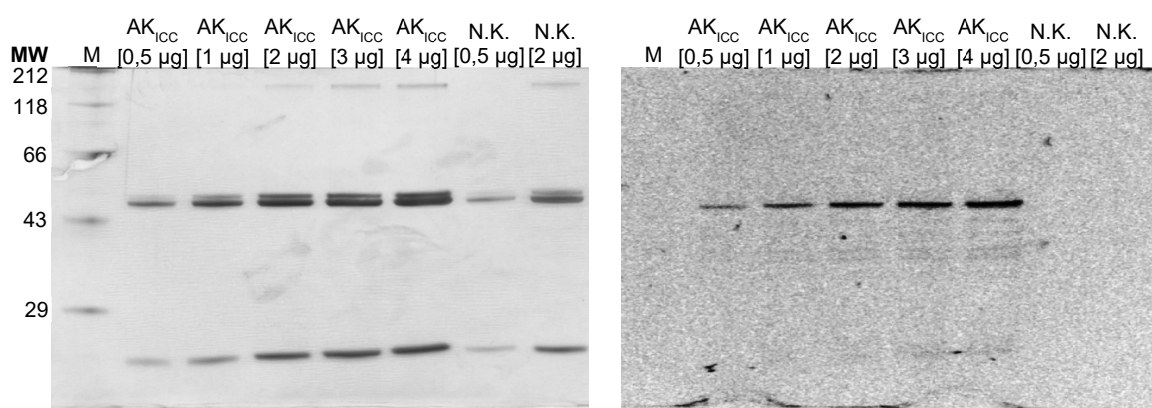


Abbildung 3.28: 15 %-iges reduzierendes Tricin-SDS-Gel verschiedener Mengen des markierten Antikörpers (AK_{ICC}) und der Negativkontrolle (N.K.). Links sieht man die Silberfärbung, auf der rechten Seite ist eine invertierte Aufnahme des Fluoreszenzbilds dargestellt ($\lambda_{ex} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 600 \text{ nm}$).

Auf dem rechten Bild erkennt man ein deutliches Fluoreszenzsignal für die leichtere Bande der schweren Kette. Weder im Bereich der LC noch für die Negativkontrolle lassen sich Banden feststellen. Es lässt sich also zweifelsfrei behaupten, dass die Azideinführung und auch die anschließende Cycloaddition nicht nur funktioniert haben sondern auch wie gewünscht nur die HC markiert wurde. Durch die unvollständige Deglycosylierung liegt zudem in jedem Ansatz eine interne Kontrolle für eine eventuelle unspezifische Addition des Markers an den Antikörper vor. Die Bande des α -Crystallin, das als zusätzliche Kontrolle mitgeführt wurde, zeigt ebenfalls ein intensives Fluoreszenzsignal (Gel im Anhang). In Vergleichsuntersuchungen konnte bei der Azideinführung kein Unterschied zwischen der Inkubation in Tris-, Hepes- oder PBS festgestellt werden. Entscheidend scheint hier allein der leicht basische pH-Wert der Lösung von 7,9 zu sein. Die *Huisgen*-Reaktion sollte laut Literatur allgemein von dem pH-Wert wenig beeinflusst werden, sofern dieser im Bereich zwischen 4 und 12 liegt.^[302-303] Bezüglich der Höhe des Markierungsgrads des Antikörpers lässt sich mit der gewählten Methode keine Aussage treffen. Um zu überprüfen, ob der Antikörper durch die Behandlung einen Verlust

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

seiner antigenbindenden Eigenschaften erzielt hat, wurde eine ELISA mit immobilisierter platinierter KT-DNA durchgeführt. Dabei zeigte sich weder für den deglycosylierten noch für den markierten Antikörper eine Abnahme der Reaktivität. Allerdings reichte die Fluoreszenz des markierten Antikörpers nicht aus, um sie direkt zu detektieren. Stattdessen musste ein Sekundärantikörper, der spezifisch auf den cPAK reagiert und eine enzymatische Farbreaktion auslöst, eingesetzt werden. Dies ist als Indiz dafür zu werten, dass die Markierung wohl nicht quantitativ erfolgt ist.

3.2.1 Entwicklung einer Metallmarkierung

Auf Basis der mit dem Fluoreszenzfarbstoff erzielten Ergebnisse sollte nun eine Metallmarkierung entwickelt werden, die sich ebenfalls der kupferfreien *Huisgen*-Reaktion bedient. Damit ließen sich die möglichen Einsatzgebiete des Antikörpers als Sonde zur Erkennung von Cisplatin-DNA-Addukten deutlich erweitern. So könnten bspw. bei der Untersuchung einer Gewebeprobe Antigen und Antikörper simultan mittels elementmassenspektrometrischer Verfahren detektiert und sogar quantifiziert werden.

Als Komplexbildner für das Markierungsreagenz wird DOTA gewählt, da dieses eine hohe Stabilität mit Lanthanoidionen aufweist und sich sowohl molekular- als auch elementmassenspektrometrisch sehr gut nachweisen lassen.^[234] Über einen Diethylaminlinker soll dieser mit der Dibenzocyclooctin-Gruppe (DIBO-NH₂) verknüpft werden, die die nötige gespannte Alkinfunktionalität trägt. Der DOTA-Ring ist an einer Carbonsäure mit einem NHS-Ester ausgestattet, der unter basischen Bedingungen mit der freien Aminofunktion des DIBO-NH₂ unter Ausbildung einer Amidbindung reagiert (**Abb. 3.29**).

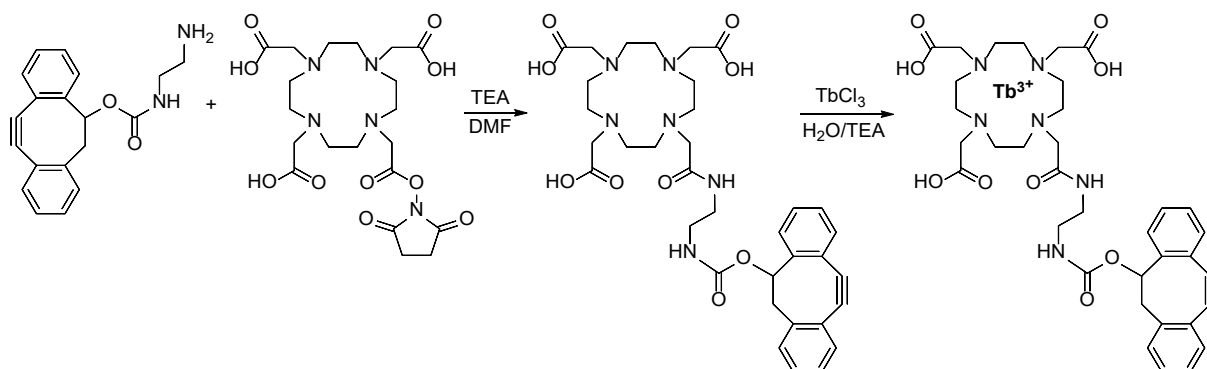


Abbildung 3.29: Synthese von DIBO-DOTA(Tb). Im ersten Schritt wird das über eine Carbamatgruppe mit Ethylendiamin verknüpfte DIBO (DIBO-NH₂, bereitgestellt von F. ABENDROTH) mit dem DOTA-NHS-Aktivester zu DIBO-DOTA umgesetzt. Anschließend erfolgt die Komplexierung mit beliebigen Lanthanoidionen, in diesem Fall mit Terbium(III), sodass das zur Markierung eingesetzte DIBO-DOTA(Tb) gebildet wird.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Um beide Komponenten vollständig zu lösen, erwies sich DMF als geeignetes Lösungsmittel. Durch die Knüpfung an das DOTA erhöht sich die Polarität des Moleküls, sodass dann Wasserlöslichkeit gegeben ist. Für die anschließende Komplexbildung wurde Terbiumchlorid in wässriger Lösung hinzugegeben. Um eine quantitative Metallierung des DOTA-Ring zu erzielen musste der pH-Wert der Lösung mittels TEA auf mindestens 6,5 eingestellt werden. Nach erfolgter Umsetzung muss das DIBO-DOTA(Tb) gereinigt werden, um überschüssiges Terbium, organisches Lösungsmittel und mögliche Nebenprodukte abzutrennen. Die Trennung erfolgte mittels präparativer Umkehrphasenchromatographie. Da sich das nicht umgesetzte DIBO-NH₂ auf einer klassischen C₁₈-Phase nicht vom Produkt separieren ließ, wurde eine für die Trennung aromatischer Verbindungen optimierte Phenyl-Hexyl-Säule verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV-Absorption bei 280 nm und ESI-MS (**Abb. 3.30**).

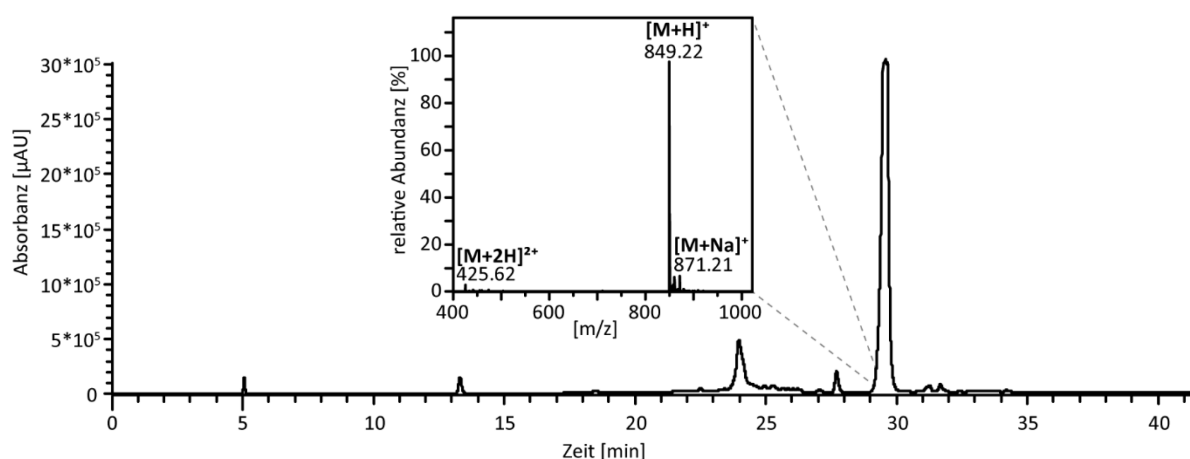


Abbildung 3.30: HPLC-UV-Chromatogramm ($\lambda = 280 \text{ nm}$) der Aufreinigung von DIBO-DOTA(Tb). Der Peak bei 29 min entspricht dem gewünschten Produkt, das zugehörige ESI-Massenspektrum ist in dem Ausschnitt gezeigt. Nach 24 min eluiert nicht reagiertes DIBO-NH₂ und bei 5 min der freie DOTA(Tb)-Komplex. Bei dem Peak bei 27 min handelt es sich um das Hydrolyseprodukt von DIBO-DOTA(Tb).

Mit Hilfe der gewählten Methode lassen sich demnach alle unerwünschten Edukte sauber abtrennen. Des Weiteren konnte neben dem gewünschten Produkt ein weiteres mit einer um 18 Da größeren Masse detektiert werden. Hierbei dürfte es sich um das Hydrolyseprodukt des DIBO-DOTA(Tb) handeln, bei dem Wasser in einem elektrophilen Angriff an die Dreifachbindung addiert wurde. Dabei handelt es sich um eine vor allem unter sauren Bedingungen bekannte Degradationsreaktion für Alkine, die sie für den Einsatz in der Click-Chemie unbrauchbar macht. Für DIBO ist zudem eine reduktive Eliminierung an der Linkerposition vorstellbar, da dadurch ein vollständig durchkonjugiertes aromatisches System entstehen kann.^[240, 304] Im Folgenden wurde das DIBO-DOTA(Tb) verschiedenen möglichen Laborbedingungen ausgesetzt, um zu überprüfen ob es chemisch stabil bleibt und somit für eine

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

längerfristige Lagerung und Handhabung geeignet ist. Dazu wurde das Reagenz in einer Konzentration von 530 μM in Wasser gelöst und zum einen bei verschiedenen Temperaturen bis zu 3 Wochen gelagert, zum anderen dem Licht einer UV-Lampe ausgesetzt und die Lösung des Weiteren mehrfach bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und wieder aufgetaut. Die Analytik erfolgte mittels HPLC-UV-MS mit einer Detektion bei 280 nm. In **Abbildung 3.31 a** ist als Beispiel das Chromatogramm der Lösung nach fünfminütiger Bestrahlung der Lösung mit UV-Licht gezeigt.

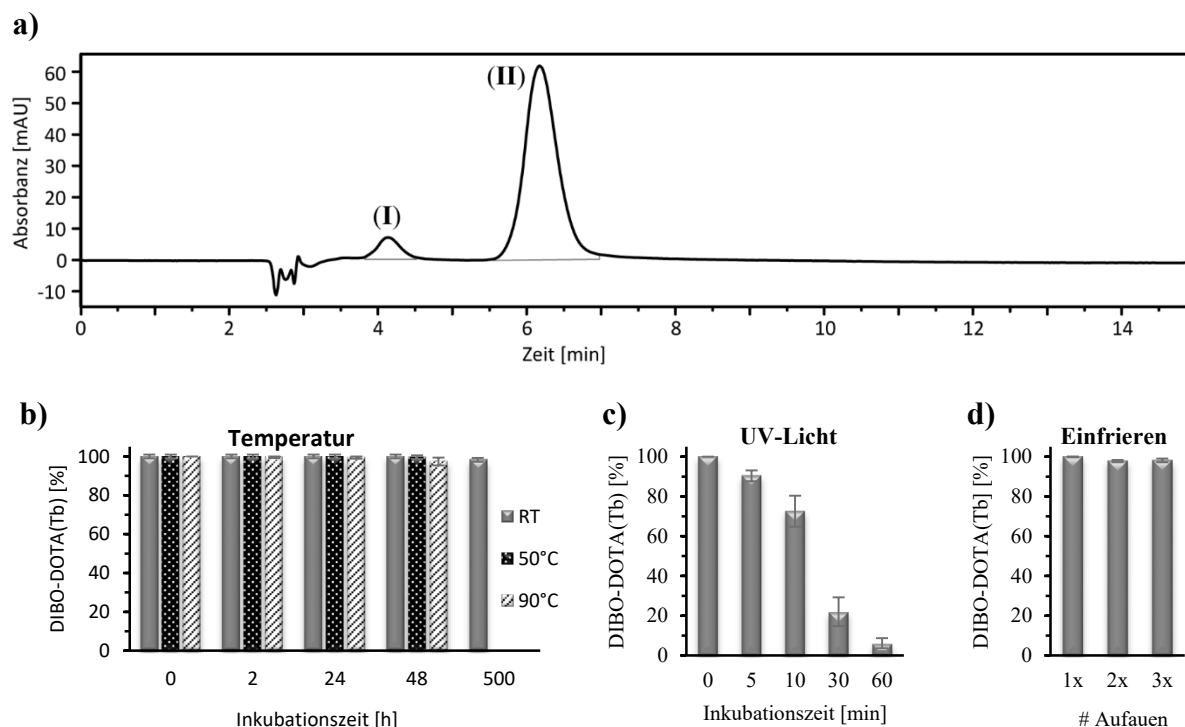


Abbildung 3.31: **a)** HPLC-UV- Chromatogramm ($\lambda = 280\text{ nm}$) von DIBO-DOTA(Tb) (Peak **II**) nach 5-minütiger Bestrahlung mit Licht einer UV-Lampe. Mittels MS konnten keine anderen Abbauprodukte als das hydrolysierte Reagenz (Peak **I**) identifiziert werden. Eine quantitative Abschätzung der Zersetzungsrate erfolgt durch Vergleich der Peakflächen von (**I**) und (**II**). **b)** Lagerung des Reagenzes bei RT, 50 $^{\circ}\text{C}$ und 90 $^{\circ}\text{C}$ für bis zu 4 Tage und ca. 3 Wochen (nur RT). **c)** Bestrahlung mit UV-Licht für 5 min bis max. 60 min. **d)** Bis zu dreimaliges Einfrieren und wieder Auftauen des Reagenzes im Tiefkühler bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Grundsätzlich können bei allen Versuchen maximal zwei Peaks detektiert werden, wobei das Signal bei 4,1 min dem Reagenz mit hydrolysierte Dreifachbindung und bei 6,2 min dem intakten DIBO-DOTA(Tb) entspricht. Auch mittels MS konnten keine weiteren Abbauprodukte identifiziert werden. Weder eine lange Lagerdauer von bis zu drei Wochen bei Raumtemperatur, noch die Erhöhung der Temperatur auf 90 $^{\circ}\text{C}$, noch wiederholtes Einfrieren und wieder Auftauen desselben Aliquots scheinen die Stabilität des Reagenzes signifikant zu beeinträchtigen. Allein die Bestrahlung mit UV-Licht führt bereits innerhalb kurzer Zeit zur Addition von Wasser an die Dreifachbindung und damit zur Abnahme der reaktiven Spezies.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Nach 10 min sind noch rund 70 %, nach einer Stunde weniger als 10 % des ursprünglichen DIBO-DOTA(Tb) vorhanden. Bei der photochemischen Hydratation handelt es sich um eine literaturbekannte Reaktion, bei der durch Anregung mit UV-Strahlung sowie der Abstraktion eines Protons vom Lösungsmittel an Alkinen zunächst ein hochreaktives Radikalkation gebildet wird. Im nächsten Schritt reagiert Wasser in einer nukleophilen Addition gefolgt von der Abspaltung eines Protons. Im Fall des DIBO-DOTA(Tb) wird der radikalische kationische Zwischenzustand durch die benachbarten Phenylringe besonders stabilisiert (**Abb. 3.32**).^[305]

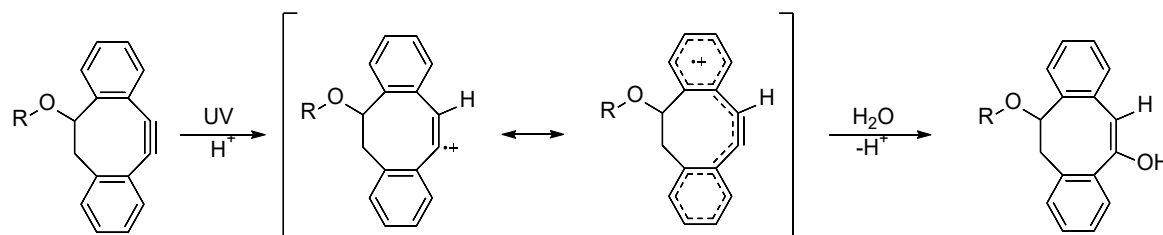


Abbildung 3.32: UV-induzierte photochemische Hydratation der Dreifachbindung im DIBO-DOTA(Tb). Über einen radikalischen Zwischenzustand wird zunächst ein Proton und anschließend Wasser nukleophil addiert.

Das Markierungsreagenz weist also unter laborüblichen Bedingungen eine hohe Stabilität auf und kann in gelöster Form bedenkenlos längerfristig im Labor gelagert werden, allein die Exposition gegenüber UV-Licht sollte vermieden werden.

Vor der Markierung des Antikörpers wurden zunächst einige Testreaktionen mit dem synthetisierten Reagenz vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde DIBO-DOTA(Tb) mit freiem UDP-GalNAz inkubiert und die Entstehung des Produkts mit HPLC-ESI-MS verfolgt. So konnte C. BECKER in seiner Bachelorarbeit eine erfolgreiche Click-Reaktion beider Komponenten in wässriger Lösung nachweisen.^[306] Des Weiteren wurde α -Crystallin, das wie bereits erwähnt nur einen GlcNAc-Rest trägt, mit GalNAz modifiziert und anschließend das DIBO-DOTA(Tb) eingeführt. Zur Reaktionskontrolle wurde das Protein tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide mittels hochauflösender HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Sowohl die Einführung des Azids wie auch die Knüpfung der Metallmarkierung an das Protein wurden auf diese Weise einwandfrei nachgewiesen. Es konnte allerdings keine vollständig quantitative Umsetzung erzielt werden, das Glycopeptid des α -Crystallins, das nur einen unmodifizierten GlcNAc-Rest trägt, ist stets parallel nachweisbar. Diese Tatsache ließ sich auch durch Temperaturerhöhung auf 37 °C bei der Azideinführung, verlängerte Inkubationszeit und der Erhöhung des doppelten auf einen zehnfachen Überschuss an UDP-GalNAz nicht beeinflussen. Auf analoge Weise soll der Antikörper mit dem Metallkomplex markiert und die notwendigen Reaktionsschritte einzeln verfolgt werden. Zu diesem Zweck musste eine massenspektrometrische Methode gefunden werden, die es erlaubt die verhältnismäßig kleinen

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Massendifferenzen eindeutig auszumachen. Aufgrund der großen Halbwertsbreite der Signale bietet sich die native Massenspektrometrie in diesem Fall nicht an. Stattdessen wurde auf die in **Kapitel 3.1.3** etablierte Technik zur Sequenzierung des Antikörpers zurückgegriffen. Da ausschließlich das Glycopeptid von Interesse ist, bietet sich das Enzym LysC an. Das dort entstehende 23 Aminosäuren lange Peptid QSNSTLRSVSELPIVHRDWLNGK lässt sich ohne *missed cleavages* in den verschiedenen glycosylierten Zuständen sehr gut nachweisen. Für den ersten Markierungsschritt müssen zunächst die verzweigten Glycanstrukturen mittels Endo S bis auf das Asparagin-gebundene GlcNAc abgespalten werden. Die erfolgreiche Abspaltung konnte bereits mittels nativer MS (**Kap. 3.1.1**) nachgewiesen werden, wobei sowohl die fucosylierte als auch die unfucosylierte Struktur gefunden wurde. Dies lässt sich auf Peptidebene bestätigen (**Tab. 3.5**). Beide Glycopeptide liegen als drei- vier- und fünffach geladene Spezies vor, wobei erwartungsgemäß das Peptid, welches das fucosylierte GlcNAc-Motiv besitzt eine deutlich höhere Intensität im Massenspektrum aufweist. Zum Vergleich wurde ebenfalls nach nicht-deglycosylierten Spezies, in dem Fall den abundanten G0- bzw. G0F-Strukturen gesucht. Deren relative Abundanz liegt im Vergleich zu den Signalen der deglycosylierten Spezies deutlich unterhalb von 10 %. Dies bestätigt die Annahme, dass keine 100 %-ige Abspaltung der Glycanstrukturen mittels des hier verwendeten Enzyms möglich ist, jedoch ausreichend freie GlcNAc-Reste für den nächsten Schritt vorhanden sein sollten. Dazu wurde der Antikörper zunächst von PBS auf Hepes umgepuffert. Anschließend erfolgte die Umsetzung mit UDP-GalNAz und der modifizierten β -GalT1 durch Inkubation bei 4 °C über Nacht. Es wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der das Enzym nicht hinzugegeben wurde. Für die finale Markierung des Antikörpers wurde das Markierungsreagenz DIBO-DOTA(Tb) in Wasser gelöst und im Überschuss beiden Ansätzen hinzugefügt. Es folgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht. Um die Einführung der Modifikationen an die Zuckerstrukturen des Antikörpers zu überprüfen, wurden die Markierungsansätze sowie die Negativkontrollen mittels LysC proteolysiert und nach entsprechenden Glycopeptiden gesucht. Die kovalente Bindung des GalNAz an das freie Asparagin-gebundene GlcNAc kann sowohl für das fucosylierte wie das unfucosylierte Peptid bestätigt werden (**Tab. 3.5**). Beide können als vier- und fünffach geladene Spezies mit einer Abweichung von weniger als 3 ppm eindeutig identifiziert werden. In den Spektren können jedoch nach wie vor sehr intensive Signale der Glycopeptide ohne die Azidmodifikation gefunden werden. Unter der Annahme, dass die verschieden modifizierten Peptide ähnlich gut ionisieren, wurden die jeweiligen Ionen aus dem Massenchromatogramm extrahiert, die entsprechenden Peakflächen integriert und miteinander verglichen. Basierend darauf lässt sich vermuten, dass an weniger als 10 % der GlcNAc-Reste

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

ein Galactosylazid eingeführt wurde. Nicht fucosylierte Antikörper scheinen dabei zu durchschnittlich mit etwas besserer Ausbeute funktionalisiert zu werden. Das legt die Vermutung nahe, dass die Kernfucose die Zugänglichkeit für das Enzym zusätzlich einschränkt, sodass die enzymatische Reaktion weniger effizient stattfinden kann. Die Markierung des azidmodifizierten Antikörpers mit DIBO-DOTA(Tb) konnte ebenfalls auf Peptidebene bestätigt werden. In den Massenspektren finden sich Signale der vier- und fünffach geladenen fucosylierten und unfucosylierten Spezies, die sich in der Retentionszeit deutlich von den Peptiden unterscheiden, die ausschließlich Zuckerreste tragen (**Tab. 3.5**). Durch die Modifikation werden die Peptide nicht nur mit einer Massendifferenz von 859 Da deutlich schwerer sondern auch unpolarer. Die Tatsache, dass nach wie vor die vier- fünffach geladenen Signale der Galactosylazid-Peptide gefunden werden, zeigt, dass keine quantitative Umsetzung stattgefunden hat. Legt man die Signalintensitäten der vier- und fünffach geladenen Spezies zu Grunde, so werden gut ein Viertel der Azidogruppen mittels Click-Reaktion mit DIBO-DOTA(Tb) umgesetzt. Ein Unterschied zwischen fucosyliertem und unfucosyliertem Antikörper lässt sich hier nicht feststellen.

Tabelle 3.5: Übersicht über die verschiedenen Modifikationen am Glycosylierungsmotiv des Antikörpers, die anhand der durch Proteolyse mit LysC erhaltenen Glycopeptide detektiert werden konnten. Neben dem Molekulargewicht sind die chromatographische Retentionszeit sowie die detektierten Ladungszustände und die dazugehörige Abweichung vom theoretischen m/z-Wert angegeben.

Peptidmodifikation am Asp293	MW [Da]	r.t. [min]	Ladungszustand		
			[M+3H] ³⁺	[M+4H] ⁴⁺	[M+5H] ⁵⁺
GlcNAc	2838,4623	21,6	-1.0 ppm	-1.4 ppm	-1.9 ppm
GlcNAc(Fuc)	2984,5203	21,4	-0.9 ppm	-0.9 ppm	-1.5 ppm
GlcNAc-[GalNAz]	3082,5431	21,7	-	0.0 ppm	-0.1 ppm
GlcNAc(Fuc)-[GalNAz]	3228,6011	21,5	-	-2.1 ppm	0.3 ppm
GlcNAc-[GalNAz]-[DIBO-DOTA(Tb)]	3930,7619	23,5	-	-2.0 ppm	-1.0 ppm
GlcNAc(Fuc)-[GalNAz]-[DIBO-DOTA(Tb)]	4076,8199	23,5	-	-1.9 ppm	-1.1 ppm

Allgemein fällt die Ausbeute der beiden Markierungsschritte geringer aus, als man vermuten könnte. Auch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37 °C brachte keine Verbesserung. Eine mögliche Erklärung lässt sich in der Struktur des Antikörpers finden. Im nativen Zustand liegen die Zuckerreste innen zwischen den beiden CH₂-Regionen. Auf diese Weise wird die räumliche Struktur des Antikörpers stabilisiert und in gleichem Maß die Glycane nach außen sterisch abgeschirmt. Detergenzien könnten zwar eventuell die Zugänglichkeit erhöhen, jedoch genauso zur Denaturierung und damit zum Verlust der Funktionalität des Antikörpers führen. Dies würde ihn für eine mögliche spätere Anwendung zur Antigenerkennung unbrauchbar machen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.3 Wahl und Charakterisierung der Antigene des cPAK

Durch die Herstellung und verschiedene Voruntersuchungen u.a. mittels ELISA ist bekannt, dass der Antikörper hauptsächlich auf die 1,2-Pt(GG)-Addukte Cisplatin-geschädigter doppelsträngiger Kalbthymus-DNA reagieren soll.^[2] Die Untersuchung von Antigen-Antikörper-Komplexen des cPAK mittels nativer MS erfordert die Herstellung definierter Antigene, da die Spektren sonst aufgrund der Komplexität nicht auswertbar wären. Zu diesem Zweck wurde ein synthetisches 50-basenpaarlanges DNA-Oligomer (ss1) verwendet, in dessen Sequenz sich genau ein Guanin-Guanin-Paar befindet, welches die bevorzugte Angriffsstelle für Cisplatin darstellt. Der Doppelstrang wurde entsprechend mit dem komplementären DNA-Strang (ss2) gebildet (**Tab. 3.6**).

Tabelle 3.6: Sequenz und Molekulargewicht der synthetischen DNA-Einzelstränge ss1 und ss2 sowie des Doppelstrangs ds12. Die bevorzugte Platinierungsstelle ist fett hervorgehoben

	Sequenz 5' → 3'	MW [Da]
ss1	TTTAACTATTCTAATTTCTTTATT GG TATTCTTTAATCTTATCAATTT	15208,48
ss2	AAATTGATAAGATTAAAGAAATAACCAATAAAGAAATTAGAATAGTTAAA	15530,72
ds12		30739,20

Die Reinheit der Einzelstrang-DNA-Oligomere wurde zunächst mittels HPLC-UV und nativer TBE-PAGE überprüft (**Abb. 3.33**). Die Hybridisierung zum Doppelstrang wurde, analog zu den gewünschten Analysebedingungen des cPAK bzw. später des Antigen-Antikörper-Komplexes mittels nativer nano-ESI-MS in 200 mM Ammoniumacetatlösung durchgeführt.

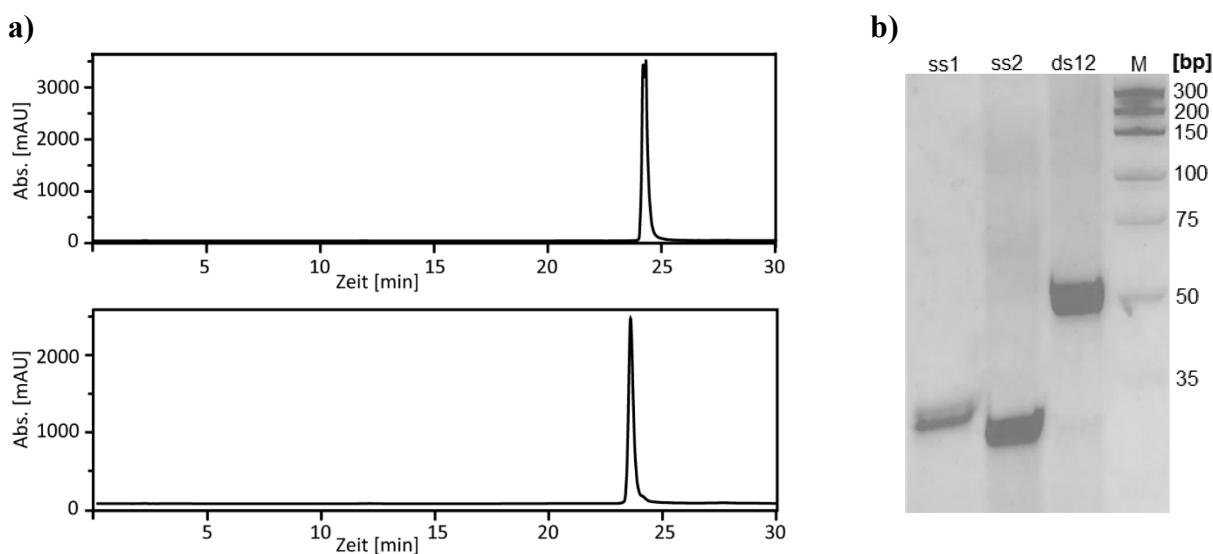


Abbildung 3.33: a) HPLC-UV-Chromatogramm von je 50 pmol ss1 (oben) und ss2 (unten) bei einer Wellenlänge von 260 nm. b) Natives 17,5 %-iges TBE-Gel der beiden Einzelstränge und des Doppelstrangs ds12. Als Marker wurde ein DNA-Standard aus ds-DNA-Oligomeren eingesetzt (Länge in Basenpaaren [bp]).

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das HPLC-Chromatogramm zeigt sowohl bei einer Wellenlänge von 280 nm als auch bei 260 nm keinerlei Verunreinigungen. Zur Analytik mittels nativer MS wurden die Einzelstränge in Ammoniumacetatlösung verdünnt und analysiert. Der neutrale pH-Wert der Lösung führt dabei dazu, dass die DNA-Oligomere in relativ wenigen und niedrigen Ladungszuständen vorliegen. Die hier gezeigten Massenspektren des ss1 und ss2 wurden unter negativer Ionisation aufgenommen, da so auch bei geringer DNA-Konzentration sehr gute Signalintensitäten und Auflösung erzielt werden können (**Abb. 3.34**). Bei einer DNA-Konzentration von 10 μM können auch im positiven Modus erfolgreich Signale (Ladung 6+ – 8+) für beide Einzelstränge detektiert werden (Spektrum im Anhang). Im Vergleich mit den Signalen, die bei negativer Ionisation generiert werden, zeigen diese allerdings eine vergleichsweise geringe Intensität.

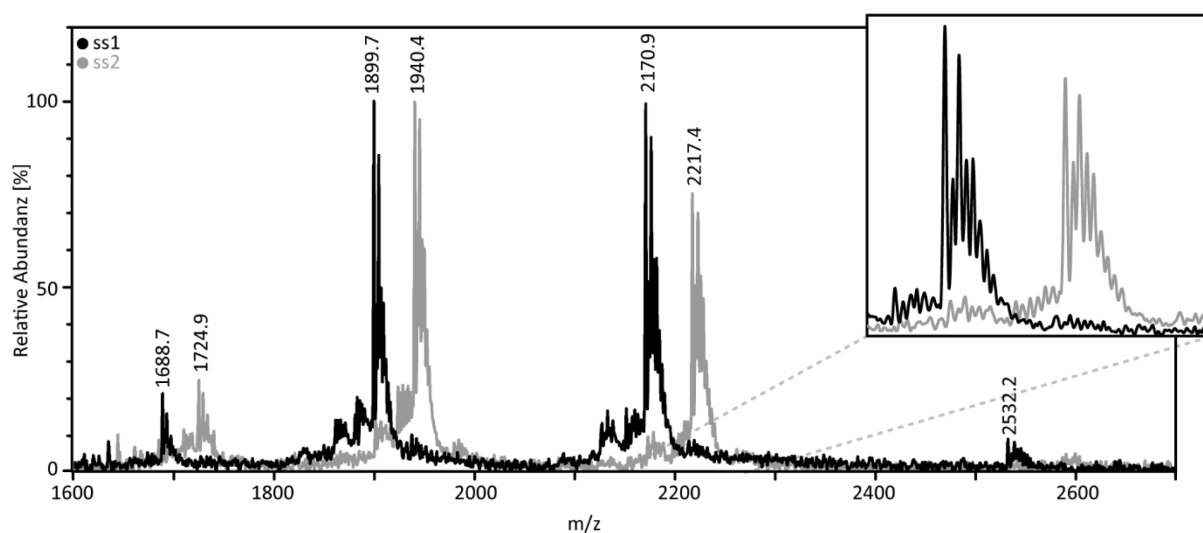


Abbildung 3.34: Überlappende nano-ESI Q-ToF-Massenspektren des ss1 (schwarz) und ss2 (grau) in einer Konzentration von 1 μM in 200 mM NH_4OAc bei negativer Ionisation und einer KE von 40 eV.

Für den ss1 (schwarz) werden die Ladungszustände von 6- – 9- detektiert. Erwartungsgemäß ist das Oligomer bei negativer Ionisation stärker geladen als bei positiver, da die DNA bei neutralem pH-Wert bereits als Polyanion vorliegt und nur einige Phosphate protoniert werden müssen.^[307] Des Weiteren kann ein Zusammenhang zwischen der Intensität der einzelnen Ladungszustände und der Kollisionsenergie beobachtet werden. So werden mit steigender KE zunehmend weniger stark geladene Spezies gebildet. Eine Begründung dafür liegt im Mechanismus der Protonierung durch die Ammoniumionen. Mit zunehmender Kollisionsenergie werden mehr Ammoniakmoleküle freigesetzt, während die Protonen an der DNA verbleiben, sodass insgesamt weniger negative Ladungen vorhanden sind.^[308] Ab einer Kollisionsenergie von 50 eV treten zunehmend Fragmentierungen auf, die in einem Intensitätsverlust der Einzelstrangsignale resultieren. Als Kompromiss zwischen möglichst großer Desolvatisierung und hoher Intensität hat sich eine Kollisionsenergie von 40 eV als

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Optimum erwiesen. Zur Berechnung der Masse wurde jeweils der erste Peak der Signalserie verwendet. Das errechnete Molekulargewicht für den Einzelstrang ss1 liegt bei damit 15.204,0 ($\pm 3,3$) Da. Die weiteren Peaks entsprechen Lösungsmitteladdukten der jeweiligen protonierten Spezies. Vor dem intensiven Signal der Ladungsserie finden sich zwei kleinere, die eine Massendifferenz von 129 Da bzw. 305 Da zur Masse des ss1 aufweisen. Erstere entspricht dem Verlust der Base Thymin (Neutralbasenverlust), letztere dem des gesamten Nukleotids pdT, welches sich sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende befindet. Anhand des Spektrums lässt sich nicht einwandfrei feststellen, ob es sich um dabei nur um ein massenspektrometrisches Fragmentierungsphänomen (w- bzw. d-Fragment) handelt oder um Abbruchsequenzen aus der Synthese des Oligonukleotids. Es ist weithin bekannt, dass die synthetische Herstellung von Oligonukleotiden nicht mit 100 %-iger Ausbeute verläuft und gerade die Sequenzen, die sich nur um ein Nukleotid voneinander unterscheiden schwer abzutrennen sind.^[309] Zumindest die Spezies, bei denen der Verlust des vollständigen Nukleotids auftritt (-pdT) lässt sich bereits bei einer geringen Kollisionsenergie von 10 eV detektieren. Das Spektrum des komplementären Einzelstrangs ss2 (grau) ähnelt dem des ss1 stark, wobei ein Ladungszustand weniger detektiert wird (7- – 9-). Das errechnete Molekulargewicht liegt bei 15.531,3 ($\pm 1,8$) Da. Die beiden Ladungsseries bei niedrigeren m/z-Werten weisen eine Massendifferenz von 135 Da bzw. 312 Da zum ss2 auf und können damit der Deletion eines Adenins bzw. des Nukleotids pdA aus dem Oligonukleotid zugeordnet werden. Die Analytik des ds12 mittels nativer TBE-PAGE zeigte bereits, dass die Hybridisierung zum Doppelstrang vollständig stattgefunden hat (**Abb. 3.33 b**). Es sind keine Banden für die beiden freien Einzelstränge erkennbar. Auch bei der Analytik mittels nano-ESI Q-ToF-MS konnten ausschließlich Signale des Doppelstrangs detektiert werden (**Abb. 3.35**).

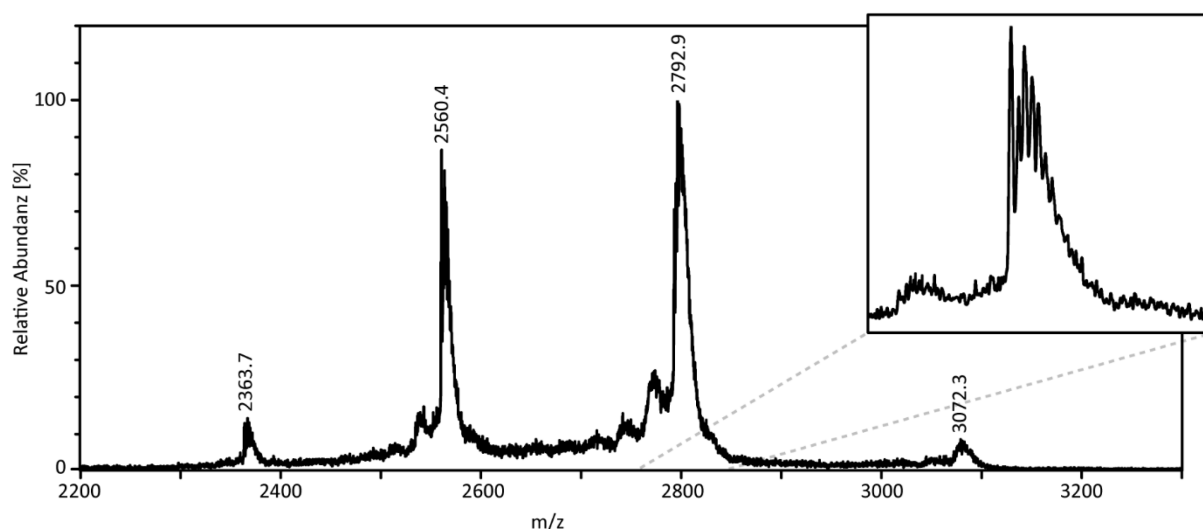


Abbildung 3.35: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des ds12 ($c = 10 \mu\text{M}$ in 200 mM NH_4OAc) bei negativer Ionisation und einer KE von 60 eV.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Es zeigte sich, dass mit einer Kollisionsenergie von 60 eV die besten Ergebnisse bezüglich Auflösung und Intensität in den Spektren erzielt werden konnten. Der Doppelstrang behält also scheinbar nicht nur seine native Struktur, sondern ist auch deutlich stabiler gegenüber kollisionsinduzierter Fragmentierung als die Einzelstränge. Es werden insgesamt vier Ladungszustände (10- – 13-) identifiziert. Das aus dem Spektrum berechnete Molekulargewicht des Doppelstrangs liegt bei 30.735,5 (\pm 3,2) Da. Wie bei den Einzelsträngen sind auch hier Signale für die unvollständig desolvatisierte Spezies identifizierbar. Hinzu kommen zwei weitere Signale, die eine Massendifferenz von ca. 300 Da bzw. 600 Da zum ds12 aufweisen. Die Auflösung reicht in diesem Fall nicht aus, um den Unterschied genauer zu bestimmen. Es ist gut möglich, dass hier eine Überlagerung der Signale der Spezies, denen jeweils nur ein Nukleotid fehlt, auftritt. Im Vergleich mit den Einzelstrangspektren kann man also vermuten, dass es sich hier ebenfalls um den Doppelstrang handelt, dem jeweils ein Nukleotid (pdA oder pdT) bzw. bei der leichteren Spezies beide Nukleotide fehlen.

Antigene durch Platinierung der Oligonukleotide

Die zur Komplexbildung benötigten Antigene werden durch Inkubation von Cisplatin mit dem jeweiligen Oligonukleotid hergestellt. Um möglichst nur eine Platinierung pro DNA-Molekül zu erzielen und auch überschüssiges freies Cisplatin in Lösung zu vermeiden, wurde maximal ein zweifacher Überschuss Cisplatin (2 eq) bezüglich der DNA eingesetzt. In einer ersten Voruntersuchung wurden die Oligomere mit Hilfe von Gelelektrophorese analysiert. Mittels TBE-PAGE ließen sich unplatinierte und platinierte Oligonukleotide nicht voneinander unterscheiden. Auf einem 5 %-igen Agarose-Gel (TAE-Puffer) konnten zumindest beim ds12 leichte Laufunterschiede festgestellt werden, der platinierte Doppelstrang zeigte eine leicht höhere Masse (Gele im Anhang). Über den Grad der Platinierung kann hier jedoch keinerlei Aussage getroffen werden. Daher wurden die platinierten DNA-Oligomere wiederum mittels nano-ESI Q-ToF-MS untersucht. In **Abb. 3.36** sind die nativen Massenspektren des platinierten ss1 zu sehen, wobei einmal ein äquimolares Verhältnis von Cisplatin (1 eq) zu DNA eingesetzt wurde und einmal ein zweifacher Überschuss (2 eq) an Cisplatin. Es sind drei Signalserien in den Ladungszuständen 6- – 9- identifizierbar, wobei die erste mit einem Molekulargewicht von 15.209,1 (\pm 2,1) Da dem unplatinierten ss1 entspricht. Die beiden anderen Spezies besitzen eine Masse von 15.435,4 (\pm 1,8) Da bzw. 15.663,2 (\pm 3,7) Da. Die Massendifferenz zwischen den einzelnen Spezies liegt bei rund 227 Da, was exakt der Anlagerung eines Cisplatin-Moleküls bzw. der reaktiven Diamminoplatinspezies entspricht. Legt man die Intensität der einzelnen

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Signale zu Grunde, so lässt sich feststellen, dass im Fall der 1:1 Platinierung über 60 % des Einzelstrangs unplatiniert sind, ca. 33 % einfach und 7 % zweifach platiniert wurden.

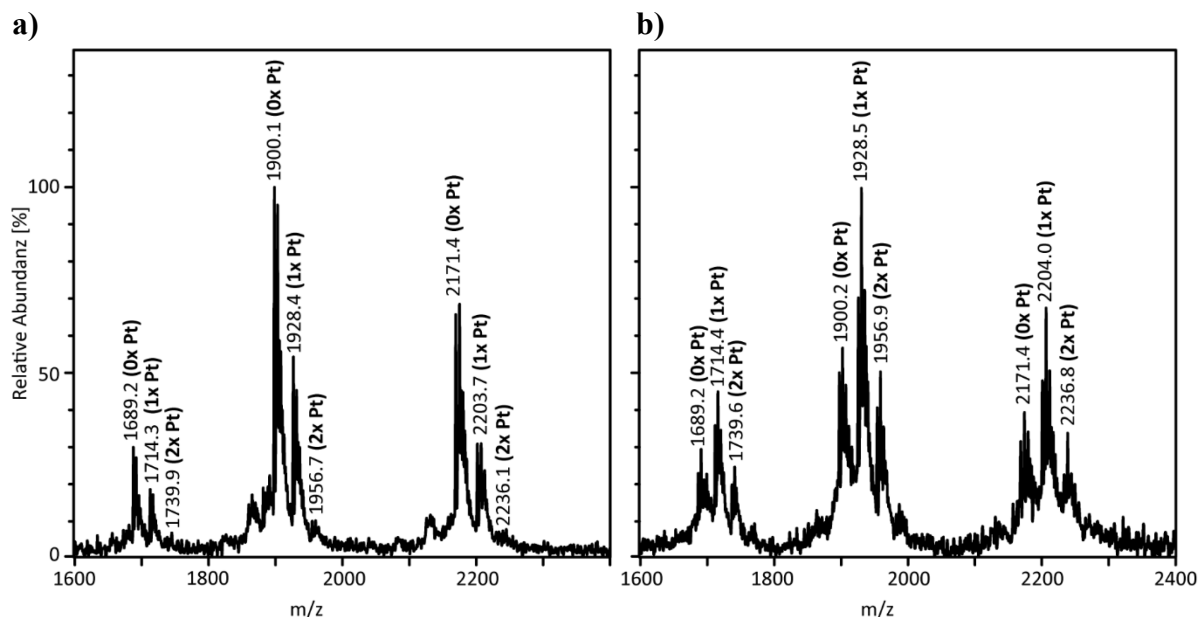


Abbildung 3.36: Nano-ESI Q-ToF Massenspektren des platinierten Einzelstrangs ss1 ($c = 1 \mu\text{M}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$) bei negativer Ionisation und einer KE von 40 eV . Die Platinierung erfolgte in verschiedenen Verhältnissen: **a)** DNA/Cisplatin 1:1, **b)** DNA/Cisplatin 1:2

Dementsprechend kann nicht ausschließlich die stark bevorzugte GG-Sequenz im Einzelstrang platiniert worden sein. Da sich auch sonst keine weiteren Guanine in der Sequenz befinden, müssen also andere Addukte gebildet worden sein. In Frage kommen dafür nur die Adenine, die entweder direkt oder über mehrere Nukleobasen verbrückt miteinander oder einem der beiden Guanine verknüpft worden sind. Eine verlängerte Inkubationszeit ändert nichts an dem relativen Verhältnis zwischen Ein- und Zweifachplatinierungen, die Reaktion ist nach 12 Stunden anscheinend beendet. Ein deutlich höherer Platinierungsgrad wird mit Verdopplung des Gehalts an Cisplatin erreicht, ungefähr die Hälfte des Einzelstrangs liegt nun einfach platiniert vor. Allerdings erhöht sich gleichzeitig auch der Anteil der zweifach platinierten Spezies auf ca. 25 %. Für die spätere Untersuchung der Antigen-Antikörper-Komplexe sollte die Verteilung innerhalb der DNA-Spezies möglichst gering sein um nicht zu komplexe Spektren zu erhalten. Daher wurde auf eine weitere Erhöhung der Cisplatin-Konzentration verzichtet. Der Einzelstrang ss2 weist bereits bei Platinierung mit nur einem Äquivalent Cisplatin zu DNA einen vergleichsweise höheren Anteil an einfach und zweifach Platinierungen auf (**Abb. 3.37 a**). Die unplatinierte Spezies mit einer Masse $15.531,2 (\pm 1,6) \text{ Da}$ ist mit rund 50 % immer noch am häufigsten. Für den zu rund 38 % einfach platinierten ss2 lässt sich ein Molekulargewicht von $15.758,1 (\pm 1,5) \text{ Da}$ bestimmen, für den zu 13 % zweifach platinierten eine Masse von $15.984,9 (\pm 1,7) \text{ Da}$.

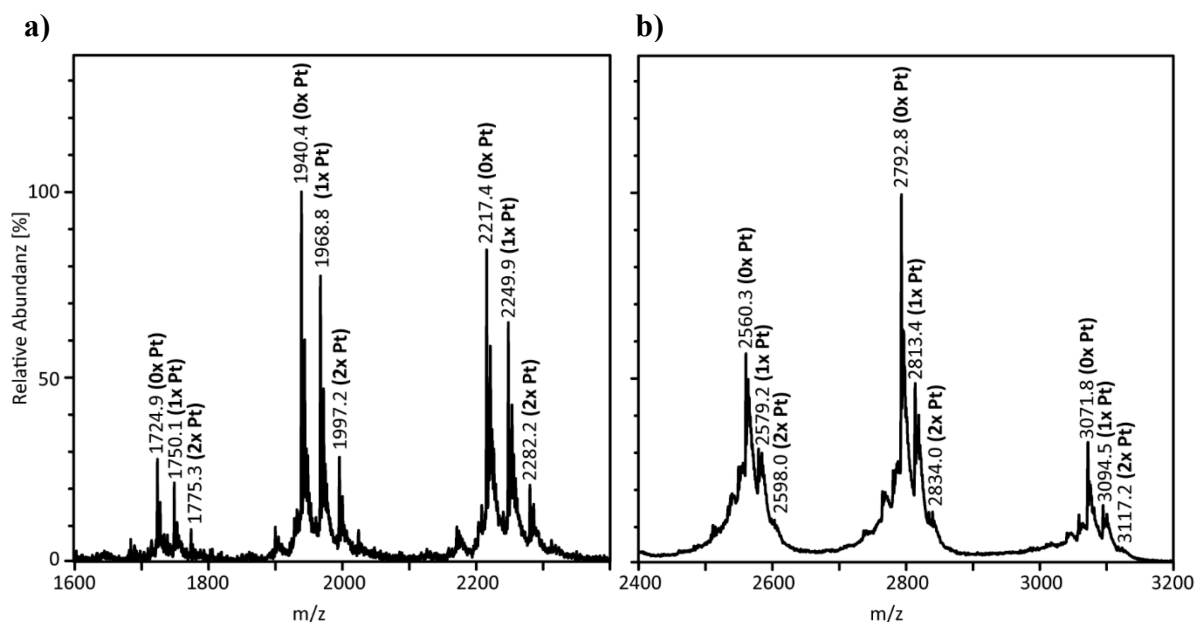


Abbildung 3.37: a) Nano-ESI Q-ToF Massenspektrum des platiniierten Einzelstrangs ss2 ($c = 1 \mu\text{M}$ in 200 mM NH_4OAc , DNA/Cisplatin 1:1) bei einer KE von 40 eV. b) Platinierter Doppelstrang ds12 ($c = 10 \mu\text{M}$ in 200 mM NH_4OAc , DNA/Cisplatin 1:1) bei einer KE von 60 eV.

Im Gegensatz zum ss1 weist der ss2 zwar keine direkt benachbarten Guaninbasen auf, allerdings dafür mehrere Guanin-Adenin-Motive (GA), die ebenfalls zu den häufig detektierten Platinaddukten zählen.^[31] Cisplatin besitzt in diesem Fall also mehrere Angriffspunkte. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass der Platinierungsgrad allgemein höher ausfällt als beim ss1 und im Besonderen mehr als ein Cisplatin pro Strang gebunden wird. In **Abb. 3.37 b** ist das Massenspektrum des mit einem Äquivalent Cisplatin platiniierten Doppelstrangs ds12, der hauptsächlich für die Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe genutzt werden soll, zu sehen. Auch hier ist das Signal der unplatiniierten Spezies mit einer Masse von $30.733,6 (\pm 3,7) \text{ Da}$ und ca. 56 % relativer Abundanz am intensivsten. Aus der zweit-intensivsten Signallerie mit 31 % relativer Abundanz lässt sich ein Molekulargewicht von $30.960,4 (\pm 3,7) \text{ Da}$ bestimmen. Die Massendifferenz entspricht wie bei den Einzelsträngen der Anlagerung der Diammoniumplatinspezies an die DNA. Die molekulare Masse für den zweifach platiniierten ds12 beträgt $31.186,4 (\pm 2,9) \text{ Da}$. Die relative Abundanz der Spezies liegt bei ca. 13 %. Die Bindung zweier Cisplatin-Moleküle scheint wie beim ss2 verglichen zum ss1 verstärkt aufzutreten. So können neben denen im Einzelstrang möglichen Intrastrang-*Crosslinks*, also z. B. GG- oder GA-Motive, auch Interstrang-*Crosslinks* auftreten.^[37]

Allgemein lässt sich festhalten, dass sowohl im Fall der Einzel- als auch der Doppelstränge keine quantitative Reaktion zwischen Cisplatin und der DNA stattfindet. Erhöht man jedoch die eingesetzte Menge an Cisplatin, treten vermehrt zweifach Platinierungen auf, die in Hinsicht

auf die Komplexbildung mit dem Antikörper möglichst vermieden werden sollen. Aus diesem Grund werden nur Platinierungen im äquimolaren Verhältnis mit Cisplatin vorgenommen.

3.4 Antigen-Antikörper-Komplexe

Zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Komplexen wurden die in **Kapitel 3.3** hergestellten und charakterisierten potentiellen Antigene, also plattinierte 50mer Oligonukleotide, verwendet. Im Rahmen erster Voruntersuchung wurde von J. HOFMANN im Rahmen ihrer Diplomarbeit jedoch zunächst überprüft, ob sich eventuell gebildete Komplexe auch schnell und unkompliziert mittels Gelelektrophorese nachweisen lassen.^[310] In diesem Fall wurde auf die Anpassung entsprechend des Platinierungsgrads verzichtet, um stets die gleich absolute Menge DNA pro Ansatz zu verwenden. Um möglichst den Erhalt der nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper zu gewährleisten, wurden die native TBE-PAGE als Methode gewählt. Unter der Annahme, dass der isoelektrische Punkt des cPAK bei rund 7,5 liegt (vgl. 2D-PAGE, **Kap. 3.1.1**, **Abb. 3.1**) sollte der Antikörper unter den gewählten Bedingungen nahezu keine Nettoladung besitzen und dementsprechend keine Migration im Gel zeigen. Die DNA hingegen ist aufgrund des Phosphatrückgrats bei neutralem und basischem pH-Wert negativ geladen und wandert daher durch das Gel Richtung Anode. Diese Annahme konnte in einem ersten Versuch bestätigt werden. So konnte keine Bande für den reinen Antikörper im Trenngel identifiziert werden (Gel nicht gezeigt). Wird der Antikörper mit unplattinierter DNA inkubiert, kann nach Färbung des Gels mit Silber nur genau eine Bande für das jeweilige ss- bzw. ds-Oligomer auf Höhe des Markers von ca. 40 - 50 bp identifiziert werden (**Abb. 3.38 a** ①, ②, ③). Die Proben, die hingegen den Antikörper und plattinierte DNA enthalten, weisen eine zusätzliche Bande oberhalb des 300 bp Markers auf (④, ⑤, ⑥). Die Wahrscheinlichkeit ist groß, dass es sich bei dieser um den Komplex handelt, der aufgrund der gebundenen DNA nun negative Ladungen besitzt und daraufhin im Gel wandert. Allerdings kann mittels Silberfärbung nicht bestimmt werden, ob die Bande tatsächlich DNA enthält. Zu diesem Zweck wurde die Elektrophorese unter denselben Bedingungen wiederholt und das Gel anschließend einer Färbung mit SYBR® Gold unterzogen (**Abb. 3.38 b**). Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert ausschließlich in die DNA, was in einer intensiven Fluoreszenz resultiert, während Proteine nicht angefärbt werden. Da die Detektion mittels Fluoreszenz deutlich empfindlicher ist als mit Silber, kann es aufgrund der vergleichsweise hohen DNA-Konzentration zur Fluoreszenzlöschung kommen. Die Banden der einzel- und doppelsträngigen DNA auf Höhe von ca. 50 bp erscheinen aus diesem Grund weiß. An

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

derselben Stelle oberhalb von 300 bp, wo bei der Silberfärbung eine Bande gefunden wurde, kann ebenfalls ein Fluoreszenzsignal detektiert werden (④, ⑤, ⑥). Dies spricht dafür, dass es sich hier tatsächlich um den Antigen-Antikörper-Komplex handelt. Die Annahme wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass an entsprechender Position bei den jeweiligen Blindproben (①, ②, ③) keine Banden gefunden wurden, also ausgeschlossen werden kann, dass es sich um reine DNA handelt.

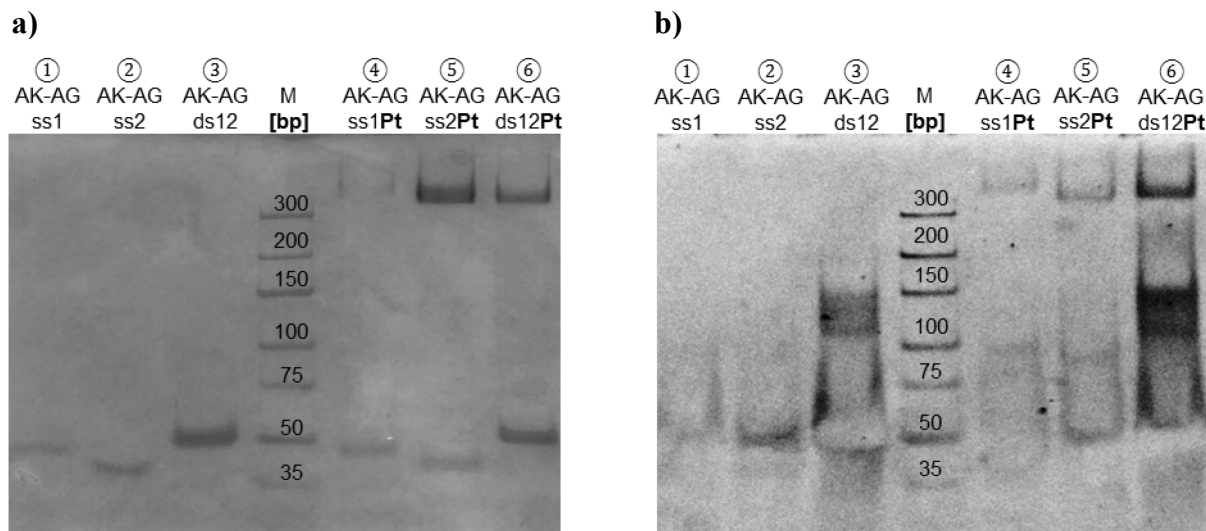


Abbildung 3.38: Native 6 %-ige TBE-Gele der Inkubation des cPAK mit unplatinierten (①,②,③) und platinierter (④,⑤,⑥) ss- und ds-DNA. Als Marker wurde ein DNA-Standard mit verschiedenen langen ds-DNA-Oligomeren eingesetzt. **a)** Silberfärbung **b)** Färbung mit SYBR® Gold. Das Fluoreszenzemissionsbild wurde invertiert ($\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$).

Interessanterweise wird nicht nur für den ds12, der das angeblich spezifische potentielle Bindungsmotiv 1,2-Pt(GG) enthält, eine Komplexbildung nachgewiesen, sondern auch für beide Einzelstränge. Fasst man diese Erkenntnis zusammen, so reagiert der Antikörper also nicht nur nicht ausschließlich auf doppelsträngige DNA, sondern es muss auch die Spezifität für das GG-Addukt in Frage gestellt werden, da der ss2 nur GA-Reihenfolgen in seiner Sequenz besitzt. Vergleicht man die Stärke der beiden Komplexbanden mit dem jeweiligen Einzelstrang, so erscheint die des ss2 zudem intensiver als die des ss1, obwohl die gleiche Menge DNA eingesetzt wurde. Wie bereits bei der Analytik der Einzelstränge mittels nano-ESI-MS festgestellt wurde, wird der ss2 vergleichsweise stärker platinert, da insgesamt mehr potentielle Bindungsstellen zur Verfügung stehen. Unter der Annahme, dass der Antikörper also nicht nur auf Pt(GG) sondern auch auf Pt(GA)-Addukte reagiert, stehen weitaus mehr Bindungs epitope zur Verfügung. Bei der Komplexbildung handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, die dadurch wahrscheinlich auf Seite des Komplexes verschoben wird. In dem fluoreszenzgefärbten Gel findet sich bei Inkubation mit dem Doppelstrang auf Höhe von 100 -

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

150 bp eine zusätzliche DNA-Bande (③, ⑥). Möglicherweise findet aufgrund der hohen Konzentration eine Adduktbildung statt, die bei der deutlich weniger empfindlichen Silberfärbung nicht detektiert werden kann.^[311]

Die nachfolgende Analytik mit nano-ESI-MS sollte die exakte Charakterisierung der möglichen Komplexe bezüglich Zusammensetzung und Molekulargewicht ermöglichen. Zu diesem Zweck sollten Antigen und Antikörper im äquimolaren Verhältnis (1:1) zueinander eingesetzt werden. Als Basis für die Konzentration des Antigens wurde der Grad der einfachen Platinierung verwendet und die Menge an DNA-Oligomer entsprechend angepasst. Für den Doppelstrang ds12 lag dieser beispielsweise bei ca. 30 %, sodass die eingesetzte Menge an DNA um den entsprechenden Faktor erhöht wurde. Nach der Inkubation wurde die Mischung aus Antigen und Antikörper mittels Zentrifugalfilter gereinigt. Die Geschwindigkeit wurde dabei auf 8000 g verringert, um einer möglichen Zerstörung des Komplexes vorzubeugen. Bezüglich der Geräteparameter erfolgte eine Orientierung an den Werten für die Analytik des reinen cPAK. Es wurde mittels positiver Spannung ionisiert, bei der sowohl der Antikörper als auch die DNA detektiert werden können. In **Abb. 3.39** ist das Massenspektrum des Komplexes bei einer Kollisionsenergie von 30 eV gezeigt.

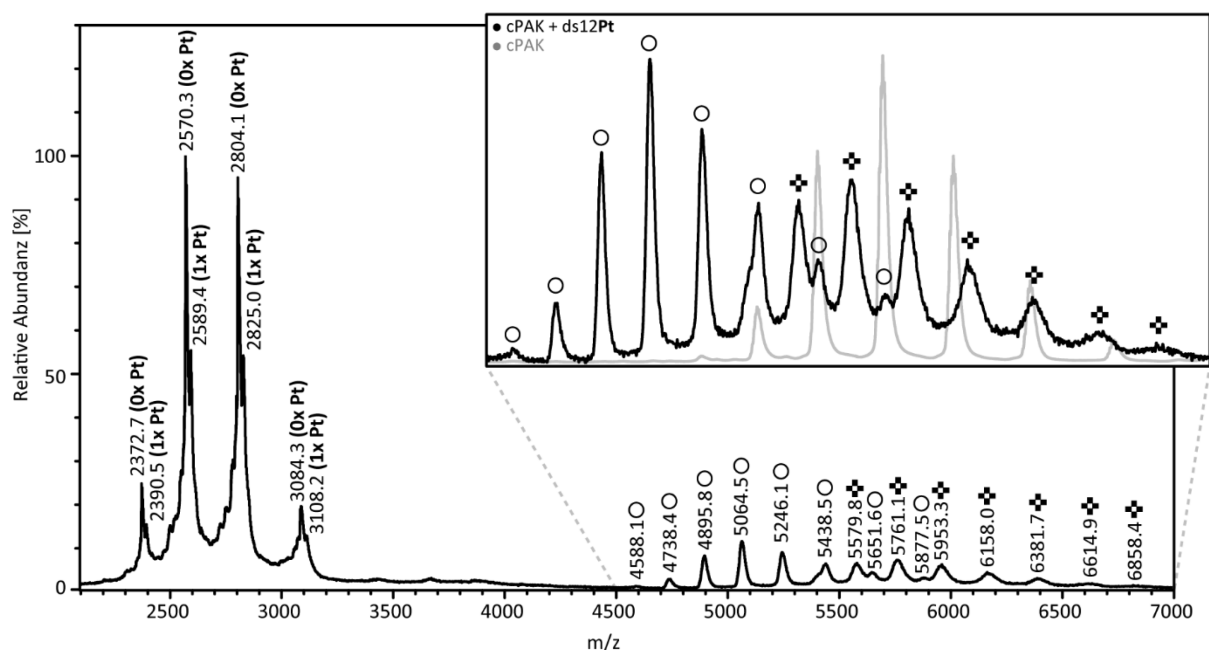


Abbildung 3.39: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des AK-AG-Komplexes ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$) mit dem plattinierten ds12 (DNA/Cisplatin 1:1) bei einer KE von 30 eV. In der Vergrößerung ist zum Vergleich zusätzlich das native Massenspektrum des cPAK bei einer KE von 100 eV gezeigt. (O = Signale des freien cPAK, + = Signale des 1:1 AK-AG-Komplexes).

Im niedrigen m/z -Bereich kann man die Signale für den unplatinierten und einfach plattinierten Doppelstrang in den Ladungszuständen $10^+ - 13^+$ eindeutig identifizieren. Im Bereich

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

zwischen $m/z = 4500 - 7000$ treten zwei Ladungsserien auf. Aus den O-markierten Signalen lässt sich ein Molekulargewicht von $146.864,1 (\pm 35,3)$ Da berechnen. Zum Vergleich ist in der Vergrößerung das native Massenspektrum des cPAK darübergerlegt. Dadurch ist erkennbar, dass die Positionen der Signale sehr gut miteinander übereinstimmen. Der Antikörper im Spektrum des Komplexes ist im Vergleich zum reinen cPAK leicht höher geladen ($25+ - 31+$), was auf leicht unterschiedliche Geräteparameter während der Messung zurückzuführen sein dürfte. Die Masse der Spezies der \clubsuit -markierten Ladungsserie ($27+ - 32+$) liegt bei $178.573,8 (\pm 35,3)$ Da. Legt man das Molekulargewicht der einfach platinieren doppelsträngigen DNA sowie das der intensivsten cPAK-Spezies zu Grunde, liegt die zu erwartende Masse geringfügig niedriger bei ca. $177.677,6$ Da. Die vergleichsweise niedrige Kollisionsenergie von 30 eV reicht wahrscheinlich nicht aus um den Komplex vollständig zu desolvatisieren. Das Intensitätsverhältnis zwischen dem freien Antigen und Antikörper sowie dem AK-AG-Komplex ändert sich nach zweistündiger Inkubation nicht mehr, das Gleichgewicht der Reaktion ist erreicht. Mit der Erhöhung der Kollisionsenergie über 50 eV auf 80 eV kann eine deutlich bessere Desolvatisierung und damit höhere Signalauflösung erzielt werden (Abb. 3.40 und Anhang).

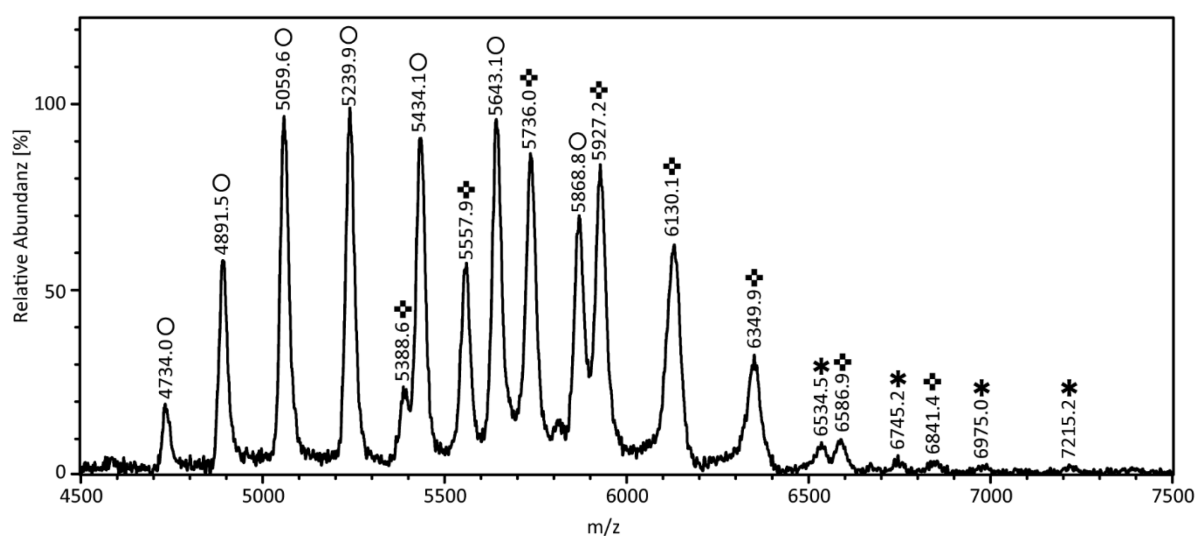


Abbildung 3.40: Ausschnitt des nano-ESI Q-ToF-Massenspektrums des AK-AG-Komplexes mit dem platinieren ds12 ($c = 1$ mg/mL in 200 mM NH_4OAc , DNA/Cisplatin $1:1$) bei einer KE von 80 eV. (O = Signale des freien cPAK, ♣ = Signale des $1:1$ AK-AG-Komplexes, * = Signale des $1:2$ AK-AG-Komplexes).

Die freien DNA-Oligomere werden ab einer Kollisionsenergie von 80 eV vollständig fragmentiert, außerdem sind im m/z -Bereich von $4000 - 5000$ Signale für den in der Gelenkregion gespaltenen Antikörper mit einer Molekulargewicht von $73.375,0 (\pm 33,4)$ Da nachweisbar (Spektrum über den gesamten m/z -Bereich im Anhang). Die Überlagerung der Signale für den freien Antikörper und den $1:1$ -Komplex nimmt deutlich ab und die Peaks

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

werden zudem schärfer. Die Auflösung liegt trotzdem noch deutlich unterhalb der, die bei der Analytik des reinen cPAK erzielt werden kann. Die Identifikation von Feinstrukturen ist nicht möglich, die Halbwertsbreite der Antikörper-Signale liegt bei ca. 30 Da. Allerdings kann neben dem bereits bei 30 eV detektierten 1:1-Komplex eine weitere deutlich weniger intensive Signalserie (*) identifiziert werden. Die errechnete Masse von 209.142,9 ($\pm 72,7$) Da entspricht der Summe aus dem Molekulargewicht des cPAK sowie dem von zwei einfach platinieren ds12. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Sterik scheinbar kein Problem für die gleichzeitige Bindung zweier Antigene darstellt. Zahlreiche Experimente haben gezeigt, dass sich diese Erkenntnisse über die Komplexbildung in der Gasphase oftmals gut auf das Verhalten in Lösung übertragen lassen.^[312-313] Die Vermutung liegt also nahe, dass es sich nicht um ein massenspektrometrisch induziertes Phänomen handelt, sondern der cPAK stets in der Lage ist zwei Antigene zu binden. In einer Blindprobe wurde der cPAK mit unplatinierten ds12 inkubiert und ebenfalls analysiert. Im entsprechenden Spektrum finden sich keinerlei Beweise für die Bildung eines Komplexes (Spektrum im Anhang). Es werden einzig die Signale des freien cPAK und des Doppelstrangs nachgewiesen. Dies stimmt gut mit den mittels nativer TBE-PAGE erhaltenen Ergebnissen überein.

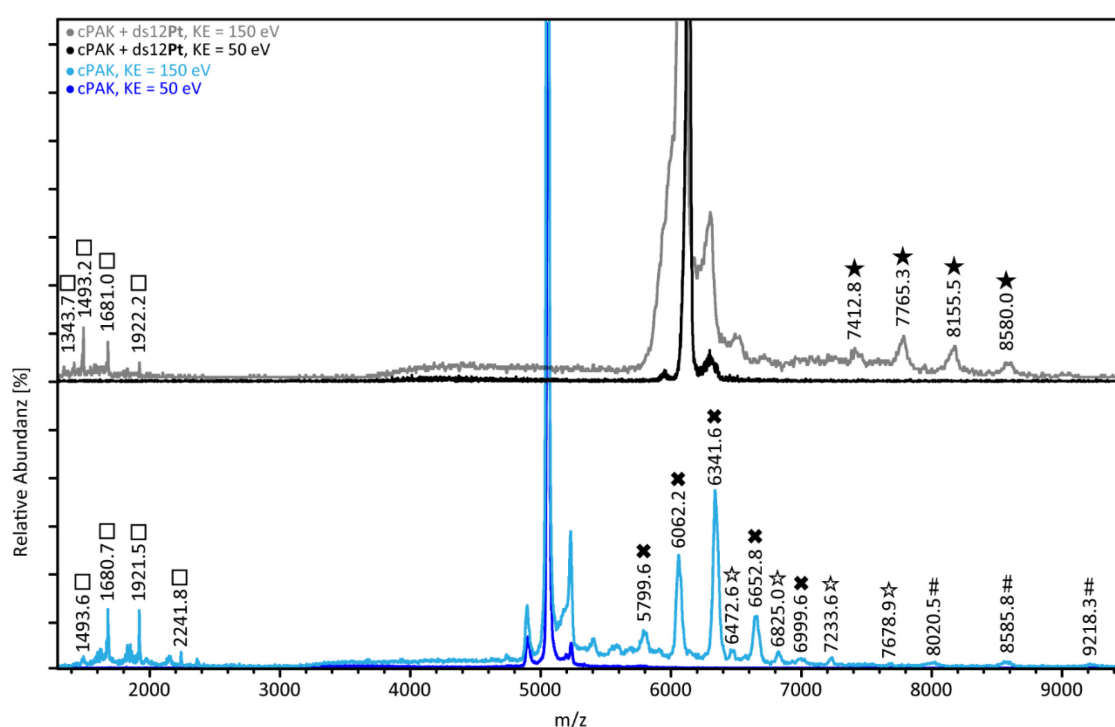
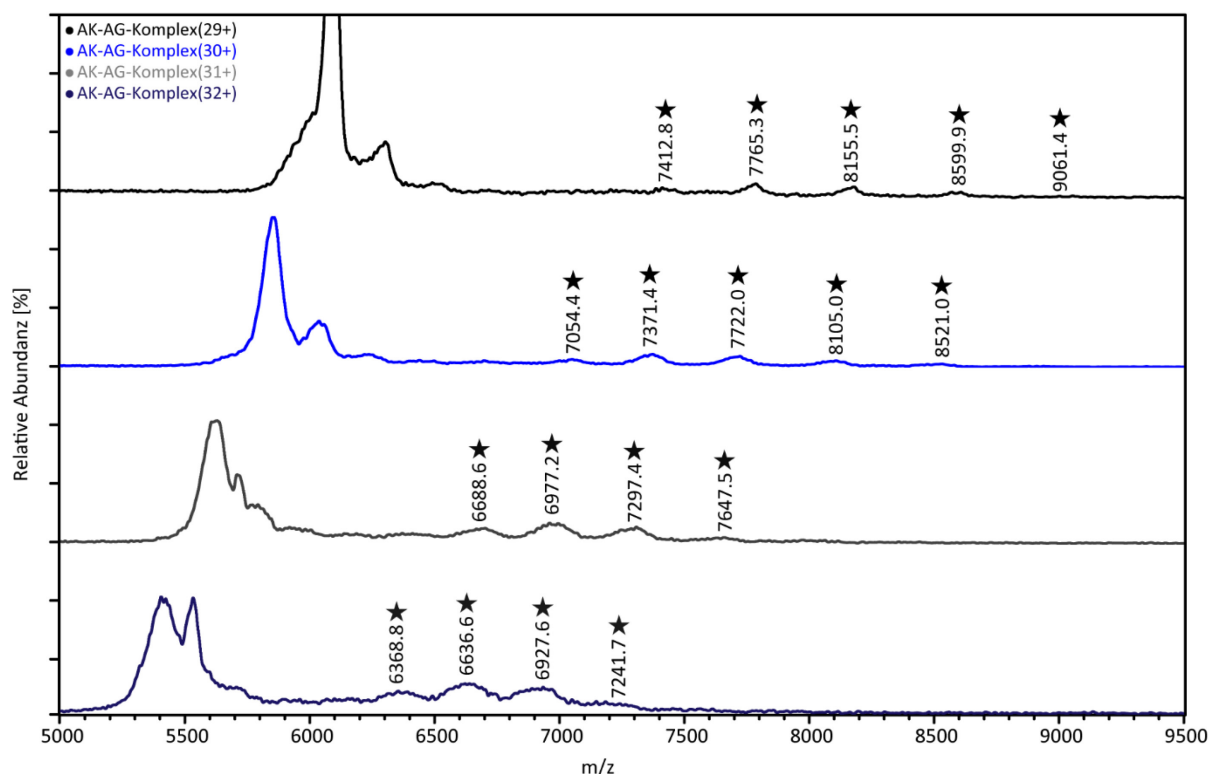


Abbildung 3.41: Nano-ESI Q-ToF-MS/MS des 29-fach geladenen 1:1 AK-AG-Komplexes bei 50 eV (schwarz) und 150 eV (grau) sowie des 29-fach geladenen AK-Signals bei 50 eV (dunkelblau) und 150 eV (hellblau).

Zur genaueren Charakterisierung sind die Signale, die dem Antikörper bzw. dem Komplex zugeordnet wurden, jeweils isoliert und gezielt bei 50 eV bzw. 150 eV fragmentiert worden, um sie direkt miteinander vergleichen zu können. Als Beispiel sind in **Abb. 3.41** die

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fragmentspektren der 29-fach geladenen Signale des cPAK ($m/z = 5059,6$) und des 1:1-Komplexes ($m/z = 6130,1$) bei einer Kollisionsenergie von 50 eV bzw. 150 eV übereinandergelegt. Der freie Antikörper (**Abb. 3.41** unten) zeigt das gleiche Fragmentierungsmuster, das bereits bei den MS/MS-Experimenten in **Kapitel 3.1.1** ausführlich beschrieben wurde. Die Spaltung in der V_H -Region des Antikörpers unter Bildung des 133,2 kDa (✕) und des korrespondierenden 13,4 kDa Fragments (□) ist stark bevorzugt. Das cPAK – 2* V_L (#) sowie das HC_2 *LC-Fragment (☆) werden aber ebenso einwandfrei detektiert. Aus dem Vorläuferion des Komplexes (**Abb. 3.41** oben) hingegen wird neben dem 13,4 kDa großen Fragment ausschließlich ein weiteres Fragment mit einem Molekulargewicht von 163.049,9 ($\pm 32,0$) Da (★) gebildet. Dies entspricht der Masse des AK-AG-Komplexes unter Verlust eines V_H -Fragments. Die Wechselwirkung zum Antigen bleibt offenbar bestehen. So sind weder für den freien Antikörper noch für seine typischen Fragmentionen Signale detektierbar. Der Vergleich mit Fragmentierungsmuster der höher geladenen Ionen der Komplexspezies zeigt, dass nach wie vor nur ein Fragment gebildet wird (**Abb. 3.42**).



	AK-AG ₂₇₊	AK-AG ₂₈₊	AK-AG ₂₉₊	AK-AG ₃₀₊	AK-AG ₃₁₊	AK-AG ₃₂₊
MW _{Fragment} [Da]	163.096,9 ($\pm 70,2$)	163.375,7 ($\pm 24,7$)	163.049,9 ($\pm 32,0$)	162.095,1 ($\pm 117,6$)	160.513,1 ($\pm 44,6$)	159.263,8 ($\pm 45,3$)

Abbildung 3.42: Nano-ESI Q-ToF-MS/MS-Spektren der 29-, 30-, 31- und 32-fach geladenen Komplexsignale bei einer KE von 200 eV. Die Molekulargewichte der Fragmente aller detektierten Komplexsignale (Ladung 27+ – 32+) sind in der Tabelle zusammengefasst.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Masse dieses Fragments nimmt allerdings zunehmender Ladung des Vorläuferions immer weiter ab, während aus geringer geladenen Ionen stets Fragmente mit einem Molekulargewicht von über 163 kDa gebildet werden. Bei dem Fragment, das aus dem 31-fach geladenen Signal ($m/z = 5557,9$) generiert wurde, liegt die Masse dagegen nur noch bei rund 160,5 Da, also ca. 3 kDa niedriger. Nach wie vor werden keine Signale für den freien Antikörper detektiert, sondern nur das 13,4 kDa V_H-Fragment. Im unteren m/z -Bereich (< 1200) werden noch einige Signale detektiert, die jedoch nicht zugeordnet werden können. Man kann also davon ausgehen, dass die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung weiterhin bestehen bleibt. Ob die Abnahme der Fragmentmasse Resultat der Spaltung des Antikörpers ist oder eventuell beginnender Fragmentation des Antigens, bspw. die Abspaltung einzelner Nukleobasen, lässt sich aus dem Spektrum nicht ablesen. Mit relativ hoher Sicherheit lässt sich jedoch feststellen, dass die Beziehung zwischen Epitop und Paratop von sehr intensiven nicht-kovalente Wechselwirkungen geprägt ist. Diese Tatsache führt dazu, dass bei Kollision mit Gasmolekülen stets zunächst kovalente Bindungen gespalten werden. Dass an den Aminosäurepositionen des Antikörpers, an denen sich ein Prolin befindet, bevorzugt gespalten wird, konnte bereits bei der Fragmentierung des freien Antikörpers ausführlich gezeigt werden (vgl. **Kap. 3.1.1**).

Aufgrund der gelelektrophoretischen Analyse wurde bereits vermutet, dass sich die Bindungsspezifität des Antikörpers nicht ausschließlich auf Pt(GG)-Läsionen beschränkt. Um diese Theorie zusätzlich zu überprüfen wurde der cPAK mit den platinieren Einzelsträngen ss1 und ss2 inkubiert. Außerdem erfolgte eine Inkubation mit unplatinierte DNA um weiterhin unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen. In **Abb. 3.43** ist eindeutig zu erkennen, dass auch mit dem platinieren Einzelstrang Komplexe gebildet werden.

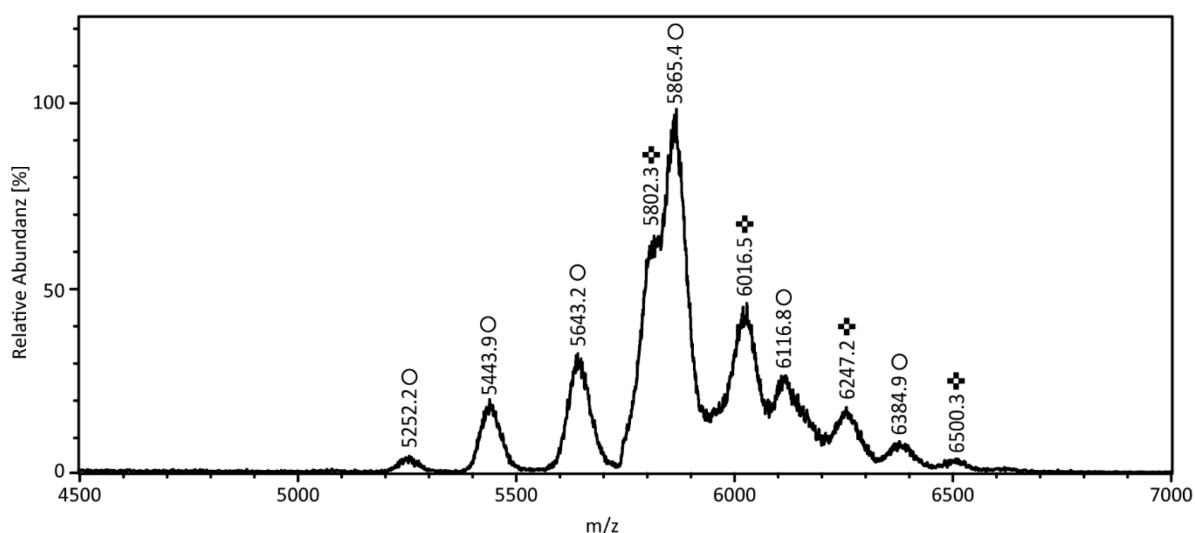


Abbildung 3.43: Nano-ESI Q-ToF Massenspektrum des AK-AG-Komplexes ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$) mit dem platinieren ss1 (DNA/Cisplatin 1:1) bei einer KE von 50 eV. (O = Signale des freien cPAK, + = Signale des 1:1 AK-AG-Komplexes)

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Massendifferenz zwischen dem Signal des cPAK und des Komplexes ist allerdings deutlich kleiner als bei dem mit dem Doppelstrang ds12. Das Spektrum kann leider nicht gut genug aufgelöst werden, um die Signale eindeutig voneinander zu trennen, zudem können nur vier Komplexsignale eindeutig identifiziert werden (Ladungszustand 25+ – 28+). Das errechnete Molekulargewicht des 1:1 AK-AG-Komplexes liegt bei 162.435,7 ($\pm 30,1$) Da. Die Differenz zur Masse des Antikörpers in dem Spektrum liegt bei 15.617,6 Da und damit leicht höher als die zu erwartende Masse des einfach platinieren Strangs. Analog zur Analytik des Doppelstrangkomplexes ist dies wahrscheinlich auf erschwerte und unzureichende Desolvatisierung zurückzuführen. Auch mit dem platinieren Einzelstrang ss2 kann die Existenz eines Komplexes durch eine Serie von drei Signalen (Ladungszustand 26+ – 28+) bestätigt werden (Spektrum im Anhang). Das Molekulargewicht des 1:1 Komplexes liegt erwartungsgemäß leicht höher als beim ss1 bei 162.832,7 ($\pm 20,9$) Da. Die Massendifferenz zum Antikörper liegt bei 15.850,0 Da. Bei beiden Einzelstrangkomplexen ist die Auflösung nicht ausreichend, um die Signale für Tandem-MS-Experimente sauber voneinander isolieren zu können. In den hier gezeigten Spektren wurde kein Signal für die freien Einzelstränge detektiert. Grund dafür dürfte die Kollisionsenergie von 50 eV sein. So konnte bei den Untersuchungen mit den reinen Einzelsträngen gezeigt werden, dass diese oberhalb einer Kollisionsenergie von 40 eV bereits vollständig fragmentieren. Mit unplatinieren DNA-Oligomeren bildet der cPAK hingegen keinerlei nachweisbare Komplexe. Im Massenspektrum können ausschließlich Signale für den freien Antikörper bzw. das entsprechende Oligonukleotid identifiziert werden (Spektrum im Anhang). Es lässt sich also festhalten, dass der Antikörper spezifisch auf platinieren DNA reagiert, wobei sowohl einzel- als auch doppelsträngige Oligonukleotide gebunden werden.

Anders als angenommen bindet der cPAK jedoch offensichtlich nicht ausschließlich Pt(GG)-Addukte, da auch mit dem ss2 die Entstehung eines Komplexes nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der gewählten Sequenz können hier nur Pt(GA)-Addukte gebildet werden. Die Ergebnisse der Negativprobe sagen aus, dass die Existenz der Platinläsion zwingende Voraussetzung für die Komplexbildung ist, während die beteiligten Nukleotide scheinbar nicht eindeutig definiert sind.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die möglichst genaue Charakterisierung eines Antikörpers bezüglich seines Aufbaus und seiner exakten Zusammensetzung sowohl auf Ebene der Aminosäuren wie der verschiedenen PTMs, als auch bevorzugte Bruchstellen, die durch gezielte Fragmentierung induziert werden können, und im Besonderen die Antigenspezifität stellen nach wie vor eine Herausforderung dar. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit eine Kombination verschiedenster hauptsächlich gelelektrophoretischer und massenspektrometrischer Verfahren angewandt um möglichst viele breit gefächerte Information zu generieren. Die Analytik mittels nativer Massenspektrometrie lieferte nach Methodenoptimierung zunächst einen guten allgemeinen Überblick über die Konstitution des Antikörpers. Bei einer Kollisionsenergie von 100 eV konnten trotz der großen Halbwertsbreite der Signale mindestens acht Feinstrukturen identifiziert werden. Das Molekulargewicht der häufigsten Antikörperspezies wurde mit 146,7 kDa bestimmt. Durch die Deglycosylierung mittels PNGase F und Endo S unter nativen Bedingungen konnte bestätigt werden, dass die Mikroheterogenitäten hauptsächlich auf unterschiedliche CH_2 -gebundene Oligosaccharide zurückzuführen sind. Des Weiteren zeigte sich, dass der cPAK ab einer Kollisionsenergie von 100 eV zu spezifischen Fragmenten zerfällt. Durch gezielte Isolation und Fragmentierung von AK-Ionen eines definierten Ladungszustands sowie Erhöhung der Kollisionsenergie auf bis zu 200 eV konnte dieser Effekt verstärkt werden. So wurden insgesamt neun verschiedene Bruchstücke detektiert, von denen sieben eindeutig bestimmten Teilen des cPAK zuordenbar waren (**Abb. 4.1**). Dabei zeigte sich, dass neben den als labile Bindungen bekannten Disulfidbrücken, also der Gelenkregion bzw. der Verknüpfung zwischen HC und LC, nachweislich an Positionen gespalten wurde, an denen sich ein Prolinrest in der Aminosäuresequenz befindet.

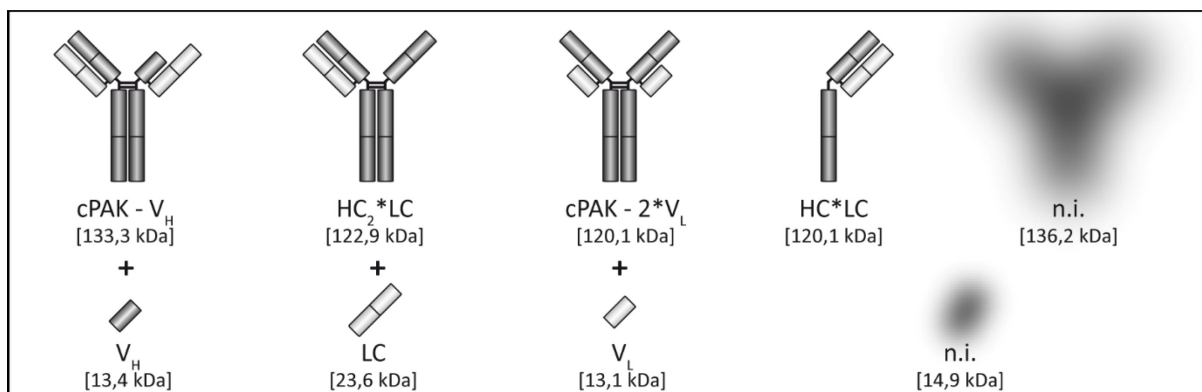


Abbildung 4.1: Intensive Fragmente des Antikörpers, die ab einer Kollisionsenergie von 100 eV in den nativen MS- bzw. MS/MS-Spektren des Antikörpers identifiziert werden konnten. Das 136,2 kDa und das 14,9 kDa große Fragment konnten keinem bestimmten Teil des Antikörpers zugeordnet werden und sind daher als nicht identifiziert (n.i.) gekennzeichnet.

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Reduktion des Antikörpers mittels TCEP führte nicht nur zur Bildung der erwarteten freien leichten und schweren Kette, sondern es konnten auch der teilreduzierte halbe Antikörper (HC*LC), das V_H-Fragment sowie zwei weitere Fragmente detektiert werden. Bei diesen handelt es sich wahrscheinlich um den Fab-Teil des Antikörpers sowie ein Fragment bestehend aus zwei leichten Ketten, das durch Reoxidation gebildet worden sein könnte.

Die Sequenzierung des Antikörpers auf Proteinebene, zur Überprüfung der von ALDEVRON auf DNA-Ebene bestimmten Aminosäuresequenz, erfolgte mit Hilfe der *Bottom-up*-Methode und der Enzyme Chymotrypsin, GluC, LysC, LysN, Thermolysin und Trypsin. Dabei zeigte sich, dass die mit Hilfe des Programms PEAKS ermittelte Sequenz der schweren Kette vor allem im Bereich der Gelenkregion und des Glycosylierungsmotivs nicht mit der ermittelten DNA-Transkription übereinstimmte. Erst durch Kombination von zweifelsfrei detektierten Abschnitten der ALDEVRON-Sequenz mit denen eines DB-bekannten Rattenantikörpers (Q5M842) konnte eine vollständige Sequenzabdeckung erzielt werden. Die Enzyme LysC, LysN und auch Trypsin erwiesen sich sowohl für die LC als auch die HC als am besten geeignete Proteasen (**Tab. 4.1**). Im Vergleich mit dem Molekulargewicht des mittels PNGase F deglycosylierten Antikörpers, das durch native MS ermittelt wurde, zeigte sich mit der neuen Sequenz eine deutlich bessere Übereinstimmung. Weitere PTMs wurden ebenfalls auf Peptidebene ausführlich untersucht, wobei neben den nachträglich eingeführten Carbamidomethylierungen an Cysteinresten hauptsächlich Oxidationen an Methioninresten gefunden wurden.

Tabelle 4.1: Übersicht über die Anzahl der detektierten Peptide sowie die erzielte Sequenzabdeckung der verschiedenen zu Grunde gelegten Proteinsequenzen durch Proteolyse des cPAK mit den sechs verschiedenen Enzymen und anschließender Analytik mittels hochaufgelöster Tandem-MS.

	HC (ALDEVRON)		HC (Q5M842)		HC (Kombi)		LC (ALDEVRON)	
	# Peptide	Seq.-Abd.	# Peptide	# Peptide	# Peptide	Seq.-Abd.	# Peptide	Seq.-Abd.
— CT	47	41 %	107	61 %	125	76 %	33	57 %
— GluC	12	23 %	152	56 %	159	71 %	49	85 %
— LysC	34	32 %	118	74 %	138	95 %	41	95 %
— LysN	32	38 %	160	71 %	163	98 %	81	100 %
— TL	31	37 %	122	57 %	130	74 %	47	62 %
— Tr	41	39 %	128	72 %	154	96 %	69	96 %
	60 %		82 %		100 %		100 %	

Die detektierten Peptide im Bereich des Glycosylierungsmotivs mit einer Länge zwischen 12 und 28 Aminosäuren bildeten die Basis für die Analytik der unterschiedlichen Glycanstrukturen. Diese konnten mit den Ergebnissen aus der Untersuchung der freigesetzten Zucker mittels MALDI-MS verglichen werden bzw. diese ergänzen. Des Weiteren wurde

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

gezeigt, dass von der G0(-gn)- bis zur G2Fgn-Struktur nahezu die vollständige Bandbreite komplexer Glycanstrukturen mit verschiedenen Graden an Galactosylierungen und/oder Kernfucosylierungen sowie *bisecting* GlcNAc-Resten am Antikörper vorkommen (**Tab. 4.2**).

Tabelle 4.2: Übersicht über alle am in der C_H2-Region des Antikörpers gebundenen komplexen Glycane. Oben sind die unfucosylierten, unten die kernfucosylierten Strukturen aufgelistet.

G0(-gn)	G1(-gn)	G0	G1	G2	G0gn	G1gn		
G0F(-gn)	G1F(-gn)	G0F	G1F	G2F	G0Fgn	G1Fgn	G2Fgn	G1FSia

Den größten Anteil macht dabei die G0F-Struktur aus, wobei allgemein fucosylierte Glycane häufiger vorhanden zu sein scheinen. Sialylierungen sind sehr gering vertreten, es konnte nur eine Struktur gefunden werden, die einen NGNA-Rest trägt (G1FSia). Diese wurde zudem ausschließlich in zwei Glycopeptiden nach Proteolyse mittels GluC bzw. LysC nachgewiesen. LysC erwies sich damit sowohl in Bezug auf die erzielte Sequenzabdeckung als auch die detektierten Glycopeptide als das geeignetste Enzym zur Proteolyse des Antikörpers.

Des Weiteren konnte die erfolgreiche Markierung des Antikörpers mit dem selbst synthetisierten Metallkomplexreagenz DIBO-DOTA(Tb) nachgewiesen werden. Dabei ließen sich alle notwendigen Reaktionsschritte über die spezifische Deglycosylierung, die enzymatische Einführung einer Azidfunktionalität bis zur kovalenten Bindung des Markierungsreagenzes auf Peptidebene nachverfolgen.

Um Aufschluss über die Spezifität des Antikörpers zu erhalten, wurden zwei 50 basenpaar lange DNA-Einzelstränge einer definierten Sequenz und der entsprechende Doppelstrang mit Cisplatin behandelt, um entsprechende Antigene zu erhalten. Nur einer der Einzelstränge und entsprechend der korrespondierende Doppelstrang enthielten zwei benachbarte Guanine in der Oligonukleotidsequenz, die platinieren das angeblich spezifische Bindungsmotiv des Antikörpers darstellen. Die Untersuchung der potentiellen Komplexbildung erfolgte mittels nativer Gelelektrophorese und nativer MS. Es zeigte sich, dass der cPAK den platinieren Doppelstrang, aber auch beide Einzelstränge bindet. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich die Spezifität des Antikörpers nicht auf 1,2-Pt(GG)-Addukte beschränkt. Scheinbar können auch andere Nukleobasenmotive, die über Cisplatin verbrückt werden, als Antigene fungieren. Die Analytik mittels MS offenbarte zudem, dass nicht nur 1:1 sondern auch 1:2 Antikörper-Antigen-Komplexe gebildet wurden. Wurden entsprechend isolierte Komplexionen einer erhöhten Kollisionsenergie ausgesetzt, wurden Signale für die aus dem Antikörper

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

freigesetzte V_H-Kette erhalten, während die Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen bestehen blieb. Dies spricht für eine sehr starke nicht-kovalente Bindung innerhalb des Komplexes.

Zur exakten Bestimmung der absoluten Masse des Antikörpers im nativen Zustand wäre eine Analytik mittels hochaufgelöster nativer Massenspektrometrie z. B. mit Hilfe einer Orbitrap-Massenspektrometers eine vielversprechende Variante.^[314] Auf diese Weise wäre nicht nur die basisliniengetrennte Auflösung der verschiedensten Zuckerstrukturen am intakten Antikörper möglich, eventuell ließen sich auch weitere PTMs bestimmen. Eine Unterscheidung zwischen natürlich oxidierten Methioninresten und nachträglich durch die Probenvorbereitung zur Antikörpersequenzierung verursachten Oxidationen ließe sich beispielsweise durch die Cyanbromidmethode treffen, da das Sulfoxid nicht mit Cyanbromid reagiert.^[315] Im Bereich der Antigen-Antikörper-Komplexe ist vor allem eine genauere Untersuchung der Antikörperspezifität von Interesse. So könnte die als Antigen verwendete DNA auf wenige Nukleobasen reduziert werden, um festzustellen, ob für die Epitoperkennung eine bestimmte Mindestlänge vorliegen muss. Um das exakte Bindungsmotiv des Antigens zu untersuchen, wäre ein kombinierter analytischer Ansatz vorstellbar. So könnte zunächst der Komplex gebildet und anschließend versucht werden, die DNA mittels Nukleasen und Phosphatasen zu verdauen. Das Epitop sollte dabei durch den Antikörper geschützt sein, sodass dieses anschließend von Antikörper abgetrennt und die genaue Zusammensetzung aus Nukleobasen und Cisplatin mittels HPLC-MS untersucht werden könnte.^[316]

Die Einführung des Metalllabels an die Zuckerstrukturen des Antikörpers bietet in den einzelnen Reaktionsschritten wahrscheinlich noch Optimierungspotenzial, um einen höheren Markierungsgrad zu erzielen. Vorstellbar wäre unter anderem neben weiterer Variation der Temperatur, der Einsatz anderer Puffersysteme oder der geringfügige Zusatz nicht-ionischer Detergenzien, wobei stets auf die Erhaltung der Antikörperfunktionalität geachtet werden muss. Eine absolute Quantifizierung des Antikörpers bei gleichzeitiger Bestimmung des Markierungsgrads könnte mittels ICP-MS erfolgen. Aufgrund der Elementspezifität der Methode kann der Metallgehalt wie auch die Gesamtmenge an Schwefel, die sich bei bekannter Anzahl der Cystein- und Methioninreste wiederum auf die Antikörpermenge zurückrechnen lässt, effizient ermittelt werden. Der gereinigte Antikörper bekannten Markierungsgrads könnte dann zur orts aufgelösten Identifikation platinierter DNA in Gewebeschnitten mittels LA-ICP-MS eingesetzt werden. Auf diese Weise kann im gleichen Maß die Verteilung des Cisplatins im Gewebe, beispielsweise gebunden an Proteine, im Vergleich zu DNA-gebundenem Cisplatin unterschieden werden.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5. Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien und Puffer

In allen Experimenten wurde stets mit deionisiertem Wasser des Reinheitsgrades Milli-Q gearbeitet. Die verwendeten Chemikalien besitzen mindestens den Reinheitsgrad *pro analysi* (p.a.). Sowohl die synthetischen Oligonukleotide als auch der unbehandelte Antikörper wurden als Stammlösung bei -20° C im Tiefkühler gelagert.

Tabelle 5.1: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
Acetonitril, HPLC grade	J.T. Baker
Aceton	J.T. Baker
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 40 %	Carl Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 40 %	Carl Roth
Ameisensäure (FA), ≥ 98 %	Carl Roth
Ammoniak-Lösung, 25 %	Riedel-de Haën
Ammoniumacetat, ≥ 97 % p.a.	Carl Roth
Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS), 98 %	Sigma-Aldrich
ArgC (Clostripain), sequencing grade	Worthington
AspN, sequencing grade	New England Biolabs
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxyl)methan (BisTris), 99 %	Carl Roth
Borsäure	Carl Roth
Bromphenolblau	Fluka
n-Butanol	Sigma
Caesiumiodid	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Merck
Chymotrypsin	Promega
cis-Diammindichloroplatin (Cisplatin)	Sigma-Aldrich
Diethanolamin	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blau G-250	Carl Roth
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), $\geq 99,5$ %	Fluka
Dimethylformamid	J.T. Baker
Dinatriummethylenediamintetraacetat, (EDTA-Na ₂), ≥ 97 %	Sigma-Aldrich
1,4-Dithiothreitol, 99 %	Acros Organics
DNA-Leiter (Gene Ruler, Ultra low range DNA-Ladder)	Thermo Scientific
Endoglycosidase S (Endo S), immobilisiert	Genovis AB
Ethanol, vergällt	J.T. Baker
Essigsäure, ≥ 99 %	Carl Roth
Formaldehyd, 37 %	Carl Roth
β -1,4-Galactosidase S	New England Biolabs
β -Galactosidase T1 (Y289L)	Life Technologies
GluC, sequencing grade	New England Biolabs
Glycerol, 99%	Sigma-Aldrich
Glycin, 99 %	Carl Roth

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Harnstoff, für Elektrophorese	Sigma-Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 99 %	Acros Organics
Iodacetamid, 98 %	Acros Organics
Isopropanol, HPLC grade	J.T. Baker
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
LysC, sequencing grade	Wako
LysN, sequencing grade	U-Protein Express BV
Mangandichlorid, ≥ 99 %	Carl Roth
2-Mercaptoethanol, ≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Methanol, HPLC grade	J.T. Baker
Natriumacetat, ≥ 99 %	Fluka
Natriumazid	Fluka
Natriumchlorid	VWR
Natriumdocecylsulfat (SDS), ≥ 99 %	Carl Roth
Natriumhydroxid	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich
Natriumthiosulfat	Kosmos
Ovalbumin (aus Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich
o-Phosphorsäure, 85 %	Carl Roth
Peptid-N-glycosidase F (PNGase F)	New England Biolabs
Proteinmarker Roti-Mark STANDARD	Carl Roth
Proteinmarker Roti-Mark PRESTAINED	Carl Roth
Salpetersäure, ultra-pure	Carl Roth
Salzsäure, 37 %	J.T. Baker
Silbernitrat	Carl Roth
SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain	Life Technologies
Terbium(III)-chlorid, $\geq 99,9$ %	Sigma-Aldrich
Tetraethylammoniumbromid	Fluka
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Thermolysin (TL)	Fluka
<i>trans</i> -Diammindichloroplatin (Transplatin)	Sigma-Aldrich
Triethylamin, $\geq 99,5$ %	Sigma-Aldrich
2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP), 98 %	Sigma
N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin), ≥ 99 %	Carl Roth
Tris(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), $\geq 99,3$ %	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth
Trifluoressigsäure	Carl Roth
Trypsin, sequencing grade (modified)	Promega
Tween 20	Sigma-Aldrich
UDP-GalNAz	Life Technologies
Zitronensäure, $\geq 99,5$ %	Riedel-de Haën

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 5.2: Verwendeter Cisplatin-DNA-spezifischer Antikörper (cPAK), Konzentration bestimmt durch UV-Absorption in der Arbeitsgruppe von J. THOMALE

Charge	Herstellungsdatum	c [mg/mL]	Lagerpuffer
(1)	28.09.2011	2,1	PBS, pH 7,2
(2)	05.08.2011	5,74	0,1 M Glycin, 0,2 M Tris, pH 7,2
(3)	12.08.2011	20,0	0,1 M Glycin, 0,2 M Tris, pH 7,2
(4)	16.03.2012	8,43	PBS, 0.02 % NaN ₃ , pH 7,4
(5)	05.06.2013	10,0	0,1 M Glycin, 0,2 M Tris, pH 7,2
(6)	22.06.2015	0,23	0,1 M Glycin, 0,2 M Tris, pH 7,4
(7)	21.08.2015	0,5	PBS, pH 7,4

Tabelle 5.3: Synthetische DNA-Oligomere von BioTeZ als 250 µM Stammlösung in Wasser.

Abk.	MW _{mono.} [Da]	MW _Ø [Da]	ε [L/mol*cm]	Sequenz (5'-3')
ss1	15.208,48	15208,48	536720	TTTAACTATTCTAATTTCTTTATTTGGT TATTTCTTTAATCTTATCAATTT
ss2	15.530,71	15530,71	657360	AAATTGATAAGATTAAAGAAATAACCA ATAAAGAAATTAGAATAGTTAAA

Tabelle 5.4: Eingesetzte Puffer, Verwendungszweck und Zusammensetzung

Puffer / Verwendung	Zusammensetzung
ArgC (Proteolysepuffer)	100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl ₂ , 5 mM DTT, 0,5 mM EDTA, pH 7,8
AspN (Proteolysepuffer)	50 mM Tris-HCl, 2,5 mM ZnSO ₄ , pH 8,0
Chymotrypsin (Proteolysepuffer)	100 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl ₂ , pH 8,0
Endo S-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM Na ₃ PO ₄ , pH 7,4
GluC (Proteolysepuffer)	50 mM Na ₃ PO ₄ , pH 7,8 (25°C Inkubation)
Glycopuffer	50 mM NaOAc, 5 mM CaCl ₂ , pH 5,5
Labeling-Puffer (2,5x)	125 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,9
LysC (Proteolysepuffer)	25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
LysN (Proteolysepuffer)	100 mM BisTris Propan, pH 10,0
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
TEAA-Puffer	20 mM Triethylamin, 20 mM Essigsäure, pH 5,5
Thermolysin (Proteolysepuffer)	50 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl ₂ , pH 7,8
Trypsin (Proteolysepuffer)	50 mM NH ₄ HCO ₃
Anodenpuffer (10x)	1 M Tris, 225 mM HCl, pH 8,9
Coomassie-Färbelösung	380 mM H ₃ PO ₄ , 1,28 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 34 % Methanol, 0,66 % Brilliant Blau G-250
DNA-Ladepuffer (6x)	10 mM Tris-HCl, 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylencyanol, 60 mM EDTA, 60 % Glycerin, pH 7,6
Kathodenpuffer (10x)	1 M Tris, 1 M Tricin, 1 % SDS
Sammelgelpuffer (8x)	1 M Tris-HCl, pH 6,8
SDS-Ladepuffer (4x)	0,25 mM Tris-HCl, 8 % SDS, 20 Vol.-% Glycerin, 0,004 % Bromphenolblau, pH 6,8 (reduzierend: 10 Vol.-% 2-Mercaptoethanol)
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris, 2,5 M Glycin, 0,1 % SDS
TBE-Puffer (10x)	890 mM Tris, 890 mM H ₃ BO ₃ , 20 mM EDTA, pH 8,0

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Tris-Gelpuffer (3x)	3 M Tris, 1 M HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45
Blocklösung (ELISA)	5 % Ovalbumin in PBS (ELISA)
PBS (ELISA)	130 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 5 mM EDTA, 0,02 % NaN ₃ , pH 7,5
PBS-T (ELISA)	0,02 % Tween in PBS (ELISA)
PNP-Puffer	1 M MgCl ₂ , 10 mM Diethanolamin, pH 9,8
Substratlösung	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat (als Tablette) in PNP-Puffer

5.2 Geräte und sonstiges

Tabelle 5.5: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
1D-Gelelektrophorese Mini-PROTEAN (Set)	Bio-Rad
Analysenwaage CP225D	Sartorius
Analysenwaage CP124S	Sartorius
Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik
Blockthermostat LS1	VLM
Element XR ICP-MS	Thermo Fisher Scientific
ELISA Plate Reader ELx 800	Bio-TEK Instruments
HPLC 1200 Series	Agilent Technologies
Image Station IS 4000MM Pro	Kodak
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4, LOC-1m	Christ
High-Mass-Q-ToF 2	Micromass (Waters), modifiziert durch MS Vision
LTQ Ionenfallen MS (LTQ-IT)	Thermo Fisher Scientific
LTQ FT Ultra (LTQ-FT-ICR)	Thermo Fisher Scientific
LTQ Orbitrap MS	Thermo Fisher Scientific
nanoHPLC 1100 Series	Agilent Technologies
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB
Präparative HPLC Thermo Separations	Thermo Fisher Scientific
pH-Messelektrode InLab Micro	Mettler Toledo
pH-Messgerät pH Level 1	Inolab
Pipetten (0.1 µL – 5000 µL)	Eppendorf
Probenschüttler MS3 basic	IKA
Probenschüttler Reax top	Heidolph
Reinstwasseranlage Purelab Plus	ELGA LabWater
SIGMA 3K30 Zentrifuge	SciQuip
Thermoschüttler MKR13	Ditabis
UV-Lampe	Carl-Roth
UV Stratalinker 1800	Stratagene
Vakuumbzentrifuge SpeedVac AES 1000	Savant Instruments

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 5.6: Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
Amberlite Kationenaustauscher	Merck KGaA
Amicon Ultra Zentrifugalfilter (3-100 kDa)	Merck Millipore
Nab Protein G Spin Columns	Thermo Fisher Scientific
Nunc MaxiSorp 96-Well Platten (ELISA Platten)	Thermo Fisher Scientific
NanoSpray Borosilikat Emitter	Thermo Scientific
Slide-A-Lyzer Mini Dialysefilter (2 kDa)	Thermo Scientific

Tabelle 5.7: Verwendete Programme

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
GlycoWorkbench 2.0	EUROCarb
mMass 5.5	Open Source Software
MassLynx 4.0	Waters
Origin 8.5	OriginLab Corp.
PEAKS 7.5	Bioinformatics Solutions Inc.
Xcalibur 2.2 SP1.48	Thermo Scientific

5.3 Methoden

5.3.1 Vorbereitung des Cisplatin-Antikörpers

Reinigung mittels Protein G Säulen

Der cPAK wurde mit maximal 500 µL Bindungspuffer (100 mM Na₃PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,2) verdünnt (AK-Konzentration \leq 5 mg/mL) und auf die mit Bindungspuffer equilibrierte Säule gegeben. Nach 10 min Schütteln wurde die Lösung durch Zentrifugation (1 min, 14000 g) entfernt und dreimal mit je 400 µL Bindungspuffer gewaschen. Vor der Elution wurden in drei Eppendorf-Gefäße mit je 40 µL Neutralisationspuffer vorbereitet (1 M Tris, pH 8,5). Anschließend wurde die Säule dreimal mit je 400 µL Elutionspuffer (100 mM Glycin-HCl, pH 2,5) gewaschen und die Lösung in dem Gefäß mit dem vorgelegten Neutralisationspuffer aufgefangen. Zur Regeneration und späteren Wiederverwendung wurde die Säule mehrfach mit Lagerpuffer (0,02 % NaN₃ in PBS) gewaschen und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Entsalzung/Umpufferung

Zur Entsalzung bzw. Umpufferung ohne Aufkonzentration wurden 20-100 µL cPAK-Lösung in einen Dialysefilter (Porengröße 2 kDa) gegeben und über Nacht unter Rühren gegen den

5. EXPERIMENTELLER TEIL

gewünschten Puffer bzw. Wasser dialysiert. Alternativ wurden Zentrifugalfilter mit unterschiedlichen Porengrößen (30 kDa – 100 kDa) verwendet. Die AK-Lösung wurde in den Filter pipettiert, für 15 min bei 14000 g zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Anschließend wurde mindestens dreimal mit 450 µL des gewünschten Puffers bzw. Wasser unter gleichen Bedingungen gewaschen. Für die Rückgewinnung der Probe wurde der Filter umgekehrt in ein entsprechendes Gefäß eingesetzt und 3 min bei 1000 g zentrifugiert. Es wurden 17 – 30 µL Lösung zurückerhalten. Dabei ist zu beachten, dass bei der Verwendung von Zentrifugalfiltern ein durchschnittlicher Probenverlust von mindestens 10% auftritt.

Reduktion

Der cPAK wurde, sofern notwendig, mit PBS auf eine Konzentration von 1 mg/mL verdünnt. Eine 50 mM TCEP-Lösung wurde jeweils frisch hergestellt. Diese wurde 1:1 (v/v) mit der Antikörperlösung gemischt und für 10 min bei 37 °C oder 90 °C inkubiert. Anschließend wurde der Antikörper mittels eines Zentrifugalfilters (10 kDa) gereinigt und gegebenenfalls auf 200 mM Ammoniumacetatlösung umgepuffert.

5.3.2 Deglycosylierung des Antikörpers

Deglycosylierung mit PNGase F in Lösung

Die vollständige Abspaltung der N-glycosidisch gebundenen Zuckerreste unter Hydrolyse der Amidbindung erfolgte mittels PNGase F. Falls nötig wurde der Antikörper mittels Zentrifugalfilter auf PBS in einer Konzentration von max. 10 mg/mL umgepuffert. Pro 50 µg Antikörper wurden 1 µL PNGase F-Lösung (500 units) zugegeben und 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert.

In-Gel-Deglycosylierung mit PNGase F

Mindestens 5 µg cPAK wurden gelelektrophoretisch getrennt, nach Färbung mit Coomassielösung die gewünschte Bande ausgeschnitten, zerkleinert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Gelstücke wurden bis zur vollständigen Entfärbung durch wiederholte Zugabe von 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat/Acetonitril (50:50 (v/v)) unter Verwerfen des Überstands gewaschen. Durch Zugabe von Acetonitril wurden die Gelstücke geschrumpft und

5. EXPERIMENTELLER TEIL

an der Vakuumzentrifuge getrocknet. 1 μL PNGase F (500 units) wurde mit 30 μL 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung verdünnt und auf die Gelstücke gegeben und 30 min quellen gelassen. Anschließend wurde so viel Ammoniumhydrogencarbonatlösung hinzugegeben, dass die Stücke vollständig bedeckt waren und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Gelstücke dreimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden an der Vakuumzentrifuge getrocknet und der Rückstand in max. 5 μL Wasser aufgenommen.

Deglycosylierung mit Endo S

Die Abspaltung der Zuckerstrukturen nach dem ersten N-glycosidisch gebundenen GlcNAc-Rest erfolgte mittels auf einer Säule immobilisierter Endo S-Glycosidase. Vor Beginn wurde die Säule dreimal mit 300 μL Endo S-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 100 μL cPAK in Endo S-Puffer (max. Konzentration 5 mg/mL) auf die Säule gegeben und 2 h bei RT geschüttelt. Die Elution erfolgte mittels Zentrifugation für 1 min bei 1.000 g, gefolgt von zweimaligem Waschen mit je 100 μL Endo S-Puffer.

Deglycosylierung mit β -1,4-Galactosidase S

Zur Abspaltung terminaler Galactose-Reste wurde die für die Anwendung an antikörpergebundene Zuckerstrukturen optimierte β -1,4-Galactosidase S verwendet. Der cPAK wurde entsalzt, mit 10x Glycopuffer versetzt und pro 10 μg eingesetztem Antikörper 0,5 μL β -1,4-Galactosidase S-Lösung (4 units) hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Vorbereitung der abgespaltenen Glycane für MALDI-MS

Für die Analytik mittels MALDI-MS wurden die Proben, die die abgespaltenen Zucker (und den Antikörper) enthielten, mittels starken Kationenaustauschers entsalzt. Dafür wurden 10 μL der Probelösung mittels Pipette auf die Austauscherkügelchen gegeben und wiederholt aufgezogen und wieder ausgestoßen.

5.3.3 Herstellung des Markierungsreagenzes DIBO-DOTA(Tb)

Synthese von DIBO-DOTA(Tb)

Die Synthese wurde nach BAUMHOVER *et al.* modifiziert.^[317] Zunächst wurden 1,95 mg DIBO-NH₂ (6,37 μ mol) gelöst und 10,27 mg DOTA-NHS (13,5 μ mol) in 45 μ L DMF gelöst und anschließend 10,6 μ L Triethylamin hinzugegeben, sodass der pH-Wert leicht basisch war. Anschließend wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Metallierung wurden 7,13 mg TbCl₃ (1,5 eq bzgl. DOTA = 19,1 μ mol) in 40 μ L Wasser gelöst und zur Reaktionsmischung hinzugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde mittels Triethylamin auf 7,0 eingestellt und zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Vor der präparativen Aufreinigung wurde die Mischung 1:1 (v/v) mit Wasser verdünnt.

Aufreinigung von DIBO-DOTA(Tb)

Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC (Thermo Separations) mit einer Phenyl-Hexyl-Säule (Phenomenex Luna, 250 mm x 10 mm, 5 μ m). Als Laufmittel kam ein Gemisch aus Methanol und Wasser bei einer Flussrate von 4 mL/min und einem Gradienten über 50 min zum Einsatz. Die Eluenten waren folgendermaßen zusammengesetzt: (A) 1 % MeOH, 0,1 % Ameisensäure, (B) 99 % MeOH, 0,1 % Ameisensäure. Der Anteil (B) wurde über 35 min von 5 % auf 90 % erhöht und anschließend über 15 min zurück auf 5 % (B) gespült. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption bei 280 nm. Mittels Fraktionssammler wurden Fraktionen zu je 1 Minute gesammelt, mittels Vakuumzentrifugation auf ca. 1 mL eingengt, anschließend bei -80 °C eingefroren und einer Gefriertrocknung unterzogen. Es wurden 4,9 mg eines farblosen kristallinen Pulver erhalten, was einer Ausbeute von 88 % entspricht. Die Reinheitskontrolle erfolgte mittels HPLC-ESI-UV-MS (s. nächster Abschnitt). Das Reagenz wurde in kristalliner Form bzw. als 530 μ M wässrige Stammlösung bei -80°C im Tiefkühler gelagert.

Reinheitskontrolle und Stabilitätsuntersuchungen von DIBO-DOTA(Tb)

Es wurde eine 530 μ M wässrige Lösung des Reagenzes hergestellt, 1:10 (v/v) verdünnt und aliquotiert. Aliquots von 50 μ L wurden bei Raumtemperatur, 50 °C und 90 °C inkubiert und nach 2 h, 24 h und 2 Tagen je 10 μ L abgenommen und direkt analysiert. Zur Überprüfung der Lagerungsbedingungen wurde der Aliquot bei Raumtemperatur insgesamt 3 Wochen im Labor aufbewahrt. Der Einfluss von UV-Licht wurde durch Bestrahlung mit einer UV-Lampe bei den diskreten Wellenlängen von 254 nm und 366 nm für 5 min, 10 min, 30 min und 1 Stunde

5. EXPERIMENTELLER TEIL

untersucht. Des Weiteren wurde ein Aliquot insgesamt dreimal aufgetaut und bei -80 °C wieder eingefroren, wobei nach jedem Schritt eine Analyse durchgeführt wurde. Die Proben wurden mittels HPLC-UV-ESI-MS mit einer Phenyl-Hexyl-Säule (Phenomenex Luna, 150 mm x 1 mm, 3 µm) analysiert. Die Trennung erfolgte während eines 20-minütigen Laufs mit isokratischem Eluentenfluss von 80 % Methanol und 0,1 % Ameisensäure bei 40 µL/min. Es wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. Die Kopplung an das LTQ FT-ICR-Massenspektrometer erfolgte über eine ESI-Ionenquelle. Die Spannung des Sprays wurde auf 4,0 kV gesetzt, der Sheathgas-Fluss lag bei 15 arb, die Kapillartemperatur bei 200 °C und die Kapillarspannung bei 50 V. Es wurden pro Messung je 2 µL der Probelösung injiziert. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Peakflächen in den HPLC-Chromatogrammen, die mit Hilfe der Agilent-Software ChemStation durch Integration ermittelt wurden.

5.3.4 Markierung des Antikörpers

Einführung der Azidfunktionalität

Nach partieller Deglycosylierung mittels Endo S wurde der Antikörper mittels Zentrifugalfilter auf 20 mM Hepes-Puffer umgepuffert. Der cPAK wurde in einer Konzentration von 2 bis max. 10 mg/mL erhalten. Je 10 µL der Antikörperlösung wurden mit 20 mM Hepes auf 40 µL verdünnt, sodass eine Konzentration von höchstens 5 mg/mL erhalten wurde. Anschließend wurden 49 µL Wasser und 80 µL Labeling-Puffer sowie 11 µL 100 mM MnCl₂-Lösung hinzugefügt und gründlich durchmischt. Nach Zugabe von 10 µL 500 µM UDP-GalNAz-Lösung wurden 50 µL der Lösung, entsprechend als Negativkontrolle abgenommen. Hier wurde entsprechend kein Enzym hinzugefügt. Zu den übrigen 140 µL wurden 7,5 µL β-GalT1 (Y289L)-Lösung (keine Angabe der Aktivität) hinzugefügt und bei 4 °C oder 37 °C über Nacht inkubiert.

Click-Reaktion mit ICC-DIBO

Der Fluoreszenzfarbstoff ICC-DIBO war in einer Konzentration von 72 µM in reinem DMSO gelöst. Um eine eventuelle Denaturierung des Antikörpers durch das organische Lösungsmittel zu vermeiden, wurde so verdünnt, dass die Endkonzentration von DMSO in der Reaktionslösung unterhalb von 2 Vol-% lag. Anschließend wurde entsprechend ein zweifacher Überschuss an ICC-DIBO hinzugefügt und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Click-Reaktion mit DIBO-DOTA(Tb)

Zur Einführung der Metallmarkierung wurde die Lösung des Azid-markierten Antikörpers mit zweifachem Überschuss an DIBO-DOTA(Tb) umgesetzt. Dazu wurde das Markierungsreagenz in einer Konzentration von 530 μM in Wasser gelöst und das entsprechende Volumen zu dem in Puffer gelösten markierten Antikörper bzw. der Negativkontrolle hinzu pipettiert. Wurden nur sehr geringe Mengen des Reagenzes benötigt, wurde die Stammlösung vorher mit Hepes-Puffer verdünnt. Alle Ansätze wurden bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

5.3.5 Herstellung der Antigen-Antikörper-Komplexe

Hybridisierung und Platinierung der DNA-Oligomere

Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Oligomere anhand der gegebenen molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte durch Absorptionsmessungen am ND-1000 Spectrophotometer. Zur Hybridisierung wurden äquimolare Mengen der komplementären Einzelstränge in 200 mM Ammoniumacetat zusammen pipettiert, für 5 Minuten auf 95 °C erwärmt und anschließend in einem Styroporblock auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Vollständigkeit der Hybridisierung wurde mittels TBE-PAGE überprüft.

Die Herstellung der potentiellen Antigene erfolgte sowohl mit der einzel- als auch mit der doppelsträngigen DNA. Dafür wurden 0,5 mg Cisplatin in 1 mL Wasser bei 37 °C vollständig gelöst. Anschließend wurden die Oligomere in einer Konzentration von 100 μM in 200 mM Ammoniumacetatlösung im molaren Verhältnis 1:1 und 1:2 (DNA/Cisplatin) mit der Cisplatinlösung bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die erhaltenen platinieren Oligomere wurden mit 200 mM Ammoniumacetatlösung auf eine Konzentration von 50 μM verdünnt und bei -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

Antigen-Antikörper-Komplexe

Für die Komplexbildung wurde der cPAK in einer Konzentration von 1-2 mg/mL in 200 mM Ammoniumacetatlösung vorgelegt und entsprechend platinierter DNA-Oligomer im gewünschten molaren Verhältnis hinzugefügt. Hierfür wurde der massenspektrometrisch bestimmte Platinierungsgrad zugrunde gelegt (z. B. 30%) und entsprechend auf das gewünschte Antigen-Antikörper-Verhältnis umgerechnet. Nach Inkubation für mindestens 2 h bei 37 °C wurde der Komplex mittels Zentrifugalfilter dreimal bei 7000 g mit je 450 μL Ammoniumacetatlösung gewaschen und bis zur Analyse bei Raumtemperatur gelagert. Die

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Blindproben, bei der der Antikörper mit unplatinierten DNA-Oligomeren inkubiert wurde, wurden unter äquivalenten Bedingungen hergestellt.

5.3.6 Gelelektrophorese

Glycin-SDS-PAGE

Die diskontinuierliche Glycin-SDS-PAGE (einfach: SDS-PAGE) wurde nach dem Protokoll von LAEMMLI durchgeführt.^[318] Trenngele unterschiedlichen Vernetzungsgrads wurden durch Mischung von Wasser, 4-fachem Trenngelpuffer und 40 %-iger Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (AA/BA (37,5:1)) entsprechend der gewünschten Zusammensetzung (**Tab. 5.8**) gemischt, mit 200 μL SDS-Lösung (10 % (w/w)), 80 μL Ammoniumpersulfatlösung (10 % (w/w)) sowie 20 μL TEMED versetzt und zwischen zwei Glasplatten auspolymerisiert. Das Sammelgel wurde analog unter Verwendung von 8-fachem Sammelgelpuffer hergestellt. Die Proben wurden je nach Wunsch mit reduzierendem oder nicht-reduzierendem 4-fachem SDS-Ladepuffer und entsprechend Wasser verdünnt, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der Masse der Antikörperbanden wurde zusätzlich ein Proteinstandard aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung wurde in 1-fachem SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,01 % SDS) bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA über ca. 1 h durchgeführt. Anschließend wurden die Proteinbanden entweder mittels Silberfärbung (0,1 μg AK/Geltasche) sichtbar gemacht oder über Nacht mit Coomassielösung (1 μg AK/Geltasche) behandelt.^[319-320] In letzterem Fall wurden die Gele am nächsten Tag durch wiederholtes Waschen mit Wasser entfärbt.

Tabelle 5.8: Zusammensetzung unterschiedlich stark vernetzter Glycin-SDS-PAGE-Gele.

	Trenngel				Sammelgel
	6 %	10 %	12 %	15 %	5 %
H ₂ O [mL]	11,7	9,7	8,7	7,2	7,25
Gelpuffer [mL]	5,0	5,0	5,0	5,0	1,25
AA/BA 40 % (37,5:1) [mL]	3,0	5,0	6,0	7,5	1,25
10 % SDS in H ₂ O [μL]	200	200	200	200	100
10 % APS in H ₂ O [μL]	80	80	80	80	60
TEMED [μL]	20	20	20	20	20

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Tricin-SDS-PAGE (nach SCHÄGGER)

Alternativ zur klassischen SDS-PAGE wurde die Tricin-SDS-PAGE nach SCHÄGGER angewendet.^[321-322] Für die Trenngele wurden je nach gewünschtem Vernetzungsgrad entsprechende Mengen an Wasser, 3-fachem Tris-Gelpuffer, 40 %-iger Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) gemischt (**Tab. 5.9**), mit 2 g Glycerol, 100 μ L Ammoniumpersulfatlösung (10 % (w/w)) sowie 10 μ L TEMED versetzt und zwischen zwei Glasplatten auspolymerisiert. Das Sammelgel wurde entsprechend analog hergestellt. Die Probenvorbereitung und die Auftragung wurden wie bei der klassischen SDS-PAGE durchgeführt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 30 V gestartet und nach 30 min auf bis zu 300 V bis zum Ende hin erhöht. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte ebenfalls entweder mittels Silberfärbung oder Coomassielösung.

Tabelle 5.9: Zusammensetzung unterschiedlich stark vernetzter Tricin-SDS-PAGE-Gele.

	Trenngel				Sammelgel
	6 %	10 %	12 %	15 %	4 %
H ₂ O [mL]	10,3	8,3	7,3	5,8	7,8
Tris-Gelpuffer (3x) [mL]	6,7	6,7	6,7	6,7	3,0
AA/BA 40 % (37,5:1) [mL]	3,0	5,0	6,0	7,5	1,2
Glycerol [g]	2,0	2,0	2,0	2,0	-
10 % APS in H ₂ O [μ L]	100	100	100	100	90
TEMED [μ L]	10	10	10	10	10

Native TBE-PAGE

Die gelelektrophoretische Analytik der DNA-Oligomere sowie des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte mittels nativer TBE-PAGE. Das jeweilige Trenngel wurde durch Mischung entsprechender Mengen Wasser, 5-fachem TBE-Puffer, 40 %-iger Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung (19:1) sowie 100 μ L Ammoniumpersulfatlösung (10 % (w/w)) und 20 μ L TEMED hergestellt und auspolymerisiert. Für das Sammelgel wurden 675 μ L 40 %-ige AA/BA-Lösung (37,5:1) und 575 μ L AA/BA-Lösung (19:1) mit den anderen Komponenten zusammengegeben und ebenfalls auspolymerisiert. Vor dem Auftrag der Proben wurde das Gel 15 min bei 15 mA vorkonditioniert. 1 μ L der Probe wurde mit 0,5 μ L DNA-Ladepuffer und 3,5 μ L Wasser versetzt, gründlich gemischt und auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der ungefähren Masse bzw. Länge der DNA wurde ein DNA-Standard eingesetzt. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA. Die Visualisierung erfolgte entweder mittels Silberfärbung oder SYBR[®] Gold Staining-Kit. Für letztere wurde das Gel 10 min in einer 1:20.000 mit 0,5-fachem TBE-Puffer verdünnten Lösung geschüttelt. Mit Hilfe

5. EXPERIMENTELLER TEIL

der Kodak Image Station fand die Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 490$ nm statt, die Detektion bei $\lambda = 530$ nm. Bei der Analytik der reinen DNA-Oligomere wurde für die Silberfärbung 1 pmol DNA/Geltasche eingesetzt, für die Fluoreszenzfärbung wurde die Lösung aufgrund der höheren Empfindlichkeit 1:100 verdünnt (10 fmol DNA/Geltasche). Von dem Komplex wurde je 0,5 μ g des cPAK und im Verhältnis 1:1 die entsprechende Menge unplatiniertes (3,4 pmol) bzw. platiniertes (11,3 pmol) DNA-Oligomere eingesetzt.

Tabelle 5.10: Zusammensetzung unterschiedlich stark vernetzter nativer TBE-PAGE-Gele.

	Trenngel			Sammelgel
	6 %	17.5 %		5 %
H ₂ O [mL]	13,0	7,25		6,75
TBE-Puffer (5x) [mL]	4,0	4,0		2,0
AA/BA 40 % (19:1) [mL]	3,0	8,75	AA/BA 40% (29:1) [mL]	1,25
10 % APS in H ₂ O [μ L]	100	100		60
TEMED [μ L]	20	20		10

2-Dimensionale SDS-PAGE

Die 2-dimensionale Gelelektrophorese des cPAK wurde von Dr. Karola Lehmann an der Proteome Factory AG durchgeführt. Dabei erfolgte in der ersten Dimension eine Fokussierung nach dem isoelektrischen Punkt gefolgt von einer klassischen Auftrennung nach der formalen Proteingröße. Anschließend wurde das Gel mittels FireSilver Staining Kit PS-2001 angefärbt.^[323]

5.3.7 Nichtkompetitiver ELISA

Die Überprüfung der Bindungsaktivität des Antikörpers mittels ELISA wurde am Universitätsklinikum Essen im Arbeitskreis von Dr. J. THOMALE durchgeführt. Zunächst wurden Nunc 96-Well Platten zunächst mit platinierter DNA beschichtet. Dafür wurde im Verhältnis 1:100 (Pt/Nukleotid) mit Cisplatin behandelte Kalbsthymus-DNA (KT) mittels Ultraschall auf eine Länge von ca. 300 Basenpaaren fragmentiert und in PBS verdünnt. Als Blindwert wurde unplatinierte KT-DNA verwendet. Zur Beschichtung wurden pro Kavität je 50 μ L der entsprechend verdünnten Lösung (10 ng – 200 ng DNA) aufgetragen und über Nacht getrocknet. Nach UV-Bestrahlung im UV Stratalinker 1800 mit dem Programm *Auto Cross Link* für 5 Minuten wurde das Plate viermal mit Wasser und einmal mit je 300 μ L/Kavität PBST

5. EXPERIMENTELLER TEIL

gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 300 μL /Kavität Blocklösung für 1 h bei 37 °C blockiert, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit Wasser und PBS-T. Sowohl der behandelte als auch zum Vergleich unbehandelter cPAK wurden in PBS verdünnt und jeweils 50 μL /Kavität (100 ng bzw. 500 ng cPAK) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde wiederum viermal mit Wasser und einmal mit 300 μL /Kavität PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Ratte IgG Alkalische Phosphatase, Stammlösung = 0,6 mg/mL) wurde 1:1.000 in 1 %-iger Ovalbuminlösung in PBS verdünnt und davon je 50 μL /Kavität für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde viermal mit Wasser und einmal mit PNP-Puffer gewaschen. Pro Kavität wurden je 100 μL Substratlösung zugesetzt und für ca. 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$ gemessen.

5.3.8 Native nano-ESI High-Mass Q-ToF-MS und -MS/MS

Für alle Messungen wurden NanoSpray Borosilikat Emitter verwendet, die stets mit 4 μL der Probelösung befüllt wurden. Von außen wurde an die Kapillare ein Druck von 20 mbar angelegt, um einen kontinuierlichen Fluss der Probelösung zu gewährleisten.

Tabelle 5.11: Wichtigste Geräteparameter des High-Mass Q-ToF-MS, ggf. exakte Werte wurden bei den einzelnen Messungen individuell angegeben.

Parameter	Größenordnung	Parameter	Größenordnung
Kapillarspannung	1,0 kV	Transport	8,0 V
Cone Spannung	10 – 100 V	Aperture 2	8,0 V
Extractor Spannung	10 – 99 V	AccV	200 V
RF Lens	0,2 V	Focus	0 V
Quellentemperatur	80 °C	Tube Lens	120 V
Desolvationstemperatur	120 °C	Offset 1	- 2,3 V
Low Mass Res	5 Da	Offset 2	0 V
High Mass Res	5 Da	Pusher	980
Kollisionsenergie (KE)	5 – 200 eV	ToF	9,1 kV
Ionenenergie	4.0 V	Reflectron	35,09 %
Steering	0 V	Zeit (Scanzeit)	80 μs
Entrance	65 V	Multiplier	650 V
Pre-filter	65 V	MCP	2300 V

Für eine korrekte Auswertung wurden mindestens 200 Einzelspektren aufsummiert, eine Untergrundkorrektur mittels Subtraktion durchgeführt (Polynomgrad 1, 40 % unterhalb der Kurve) und das resultierende Spektrum durch Anwendung eines Savatzky-Golay-Filters geglättet (Kanal: $\pm 2 \text{ Da}$, 5 Wiederholungen). Die automatisierte Dekonvolierung der Spektren

5. EXPERIMENTELLER TEIL

erfolgte mittels des in der MassLynx-Software integrierten MaxEnt1-Algorithmus. Als Massenbereich wurde abhängig von der zu erwartenden Masse der einfach geladenen Spezies gewählt, die Halbwertsbreite der Signale aus dem Spektrum abgeschätzt und als Auflösungsbreite 1 Da/Kanal gewählt. Die Kalibration des Geräts erfolgte mit Hilfe von Cäsiumiodid. Dafür wurden 5 mg/mL CsI in Isopropanol/Wasser (50:50, (v/v)) gelöst und die m/z-Werte der resultierenden Cluster im positiven Modus analysiert.

Analytik des cPAK

Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1 – 2 mg/mL in 200 mM Ammoniumacetatpuffer eingesetzt. Die Elektrosprayionisation erfolgte unter positiver Spannung bei einer Kapillarspannung von 1,0 kV. Um die geeignetsten Parameter zur möglichst vollständigen Desolvatisierung des Analyten festzustellen, wurde die Kollisionsenergie zunächst im Bereich 10 eV und 100 eV variiert. Anschließend wurden alle Messungen bei einer Cone-Spannung von 99 V, einer Extractor-Spannung von 100 V und die Kollisionsenergien von 100 – 200 eV durchgeführt. Für die MS/MS-Experimente wurde eine Isolationsbreite von 5 Da (Low Resolution) gewählt. Die Fragmentierung fand bei den diskreten Kollisionsenergien von 100 eV, 150 eV und 200 eV statt.

Analytik der unplatinierten und platinierten DNA-Oligomere

Die unplatinierten und platinierten Einzelstrang-Oligomere (ss-DNA) wurden mit 200 mM Ammoniumacetat-Puffer auf eine Konzentration von 1 μ M verdünnt, die Doppelstrang-Oligomere (ds-DNA) auf 10 μ M. Es wurde sowohl unter positiver als auch negativer Kapillarspannung von 1,0 kV ionisiert. Die Cone-Spannung wurde auf 50 V, die Extractor-Spannung auf 10 V festgesetzt. Die optimale Kollisionsenergie lag für die 50 bp-lange ss-DNA bei 40 eV, für die ds-DNA bei 60 eV. Der Platinierungsgrad wurde durch Vergleich der relativen Signalintensitäten der unplatinierten, sowie der ein- und zweifach platinierte Spezies innerhalb eines Spektrums bestimmt.

Analytik der Antigen-Antikörper-Komplexe

Der Komplex bzw. die entsprechenden Blindproben wurden bei einer Antikörperkonzentration von 2 mg/mL in 200 mM Ammoniumacetatpuffer analysiert. Die Messungen wurden bei einer

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Cone-Spannung von 50 V, einer Extractor-Spannung von 50 V und Kollisionsenergien von 30 – 80 eV durchgeführt. Für die MS/MS-Experimente wurden sowohl Signale des Komplexes als auch Signale des freien cPAK isoliert und entsprechend mittels CID fragmentiert. Es wurde eine Isolationsbreite von 5 Da (Low Resolution) und eine Kollisionsenergie von 50 eV bzw. 150 eV gewählt.

5.3.9 MALDI LTQ Orbitrap-MS und –MS/MS

Die Analytik der Oligosaccharidstrukturen wurde mittels ein mit einer MALDI-Quelle ausgestatteten LTQ Orbitrap XL Massenspektrometers durchgeführt. Die Konzentration der Zucker in Lösung lag bei mindestens 10 µM. Bei positiver Ionisation wurde eine 20 mg/mL DHB-Matrix in Wasser/Acetonitril (50:50, v/v) verwendet, bei negativer Ionisation eine 10 mg/mL THAP-Matrix in 20 mM Diammoniumcitratlösung/Acetonitril (50:50, v/v). Die Probe wurde 1:1 (v/v) mit der entsprechenden Matrix gemischt, auf das MALDI-Target pipettiert und bei RT getrocknet. Die durchschnittliche Laserenergie betrug 40 µJ. Die Fragmentierungen mittels CID erfolgten bei 35 % normierter Kollisionsenergie.

5.3.10 Sequenzierung des Antikörpers

Reduktion und Alkylierung des Antikörpers

Zur Reduktion wurde der Antikörper zunächst auf Konzentration von 1 mg/mL in 8 M Harnstofflösung verdünnt. Es wurde ein entsprechendes Volumen einer 50 mM wässrigen TCEP-Lösung hinzugefügt um eine finale Konzentration von 10 mM zu erhalten und bei RT für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde die Probe mit einem zweifachen Überschuss bezüglich TCEP an Iodacetamid-Lösung (Konzentration 100 mM) versetzt und unter Lichtausschluss für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Proteolyse des Antikörpers in Lösung

Nach Reduktion und Alkylierung wurde die Probe so weit verdünnt, dass die Harnstoffkonzentration weniger als 1 mol/L betrug, um die proteolytische Aktivität zu gewährleisten. Die Deglycosylierung des cPAK wurde vor der Proteolyse durchgeführt. Dazu wurde die Probe geteilt, zu der einen Hälfte 5 µL PNGase F-Lösung (2500 units) hinzugegeben

5. EXPERIMENTELLER TEIL

und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze (glycosyliert und deglycosyliert) auf verschiedene Eppendorfgefäße aufgeteilt, 1:30 (v/v) mit dem jeweiligen Enzympuffer verdünnt und sechs verschiedene Proteasen im Massenverhältnis 1:100 hinzugegeben. Es wurden Chymotrypsin, GluC, LysC, LysN, Thermolysin und Trypsin eingesetzt. Abgesehen von GluC, das bei RT inkubiert wurde, erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Vor der Analytik mittels nano-HPLC ESI-FT-ICR-MS/MS wurden alle Proben 1:1 (v/v) mit 2 %-iger Ameisensäurelösung verdünnt und je 1 pmol pro Messung injiziert (Methode s. **Kapitel 5.3.9**).

Proteolyse des markierten Antikörpers mittels LysC

Die verschiedenen Ansätze wurden in 8 M Harnstoff-Lösung aufgenommen, mit 2 µL 500 mM TCEP-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Anschließend wurden jeweils der zweifache Überschuss an Iodacetamid-Lösung bezüglich TCEP (4 µL einer 500 mM Lösung) hinzugegeben und erneut 20 min unter Lichtausschluss inkubiert. Die Proben wurden mit Enzympuffer auf ein Gesamtvolumen von 100 µL verdünnt, LysC im Massenverhältnis 1:100 hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt und erneut für zwei Stunden inkubiert. Die Antikörperkonzentration lag bei ca. 0,05 mg/mL. Für die Analytik mittels nano-HPLC ESI-Orbitrap-MS/MS wurde jeweils 1 pmol pro Messung injiziert (Methode s. **Kapitel 5.3.10**).

5.3.11 Analyse des proteolysierten cPAK mittels hochauflöser nano-HPLC ESI-MS/MS

Die Analytik des proteolytischen Verdaus des cPAK wurde mittels hochauflösender nano-HPLC-ESI-MS/MS durchgeführt. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels eines 1100er nano-HPLC-Systems, wobei für die Anreicherung der Peptide eine C₁₈-Umkehrphasensäule (Zorbax 300 SB C-18, 0,3 mm x 5 mm, 3,5 µm) verwendet wurde. Für die anschließende Trennung wurde ebenfalls eine C₁₈-Umkehrphasensäule eingesetzt (Zorbax 300 SB C-18 USP L1, 75 µm x 150 mm, 3,5 µm). Die Eluenten für die nano-Pumpe bei einer konstanten Flussrate von 0,35 µL/min setzten sich folgendermaßen zusammen: (A) 5 % ACN, 0,1 % Ameisensäure, (B) 99,9 % ACN, 0,1 % Ameisensäure. Für die isokratische Pumpe wurde eine Mischung aus 2,5 % ACN mit 0,1 % Ameisensäure verwendet. Bei der Analytik

5. EXPERIMENTELLER TEIL

der Proteolyse des cPAK mit den sechs verschiedenen Enzymen wurde ein Gradient von 60 min verwendet. Die HPLC wurde mittels eines NanoMate-ESI-Interface (Advion) an ein FT-ICR-Massenspektrometer (Thermo LTQ FT Ultra) gekoppelt. Als Elektrosprayspannung wurden 1,7 kV und als Kapillartemperatur 200 °C gewählt. Der Übersichtsscan wurde jeweils im FT bei einer Auflösung von 100000 über einen m/z-Bereich von 250 - 2000 aufgenommen. Die drei intensivsten Vorläuferionen wurden bei einer Isolationsbreite von m/z = 4 isoliert und mittels CID bei 35 % normierter Kollisionsenergie fragmentiert.

Die chromatographische Trennung des LysC-Verdau des Azid- und DIBO-DOTA(Tb)-markierten cPAK erfolgte analog unter Verwendung eines 30-minütigen Gradienten. Die HPLC wurde hier an ein Orbitrap-Massenspektrometer (Thermo LTQ Orbitrap XL) gekoppelt. Als Elektrosprayspannung wurden 2,4 kV und als Kapillartemperatur 200 °C gewählt. Der Übersichtsscan wurde in der Orbitrap bei einer Auflösung von 60000 über einen m/z-Bereich von 350 - 1600 aufgenommen. Die fünf intensivsten Vorläuferionen wurden bei einer Isolationsbreite von m/z = 3 isoliert und mittels CID bei 35 % normierter Kollisionsenergie fragmentiert.

Tabelle 5.12: Gradienteneinstellung der nano-HPLC-Pumpe bei einem Gradienten über 60 min (links) bzw. 35 min (rechts).

Zeit [min]	Anteil (B) [%]
0	5
5	5
45	40
50	90
54,5	90
55,5	5
60	5

Zeit [min]	Anteil (B) [%]
0	10
5	10
25	40
26	90
30	90
31	10
35	10

5.3.12 Analyse der DNA mittels HPLC-UV-ESI-MS

Die DNA-Oligomere wurden auf einem 1200er HPLC-System mittels einer C18-Umkehrphasensäule (Phenomenex Clarity Oligo-RP, 100 mm x 1,00 mm, 3 µm) und einer mobilen Phase bestehend aus einem Laufmittelgemisch aus 20 mM TEAA-Puffer (pH 5,5) und Methanol getrennt. Die UV-Absorption wurde simultan bei 260 nm und 280 nm gemessen. Es kam ein 45-minütiger Gradient bei einer Flussrate von 40 µL/min zum Einsatz. Die Eluenten waren folgendermaßen zusammengesetzt: (A) 95 % TEAA, 5 % MeOH, (B) 5 % TEAA, 95 % MeOH. Die Kopplung an das LTQ IT-Massenspektrometer erfolgte über eine ESI-Quelle. Es wurde im negativen Modus gemessen. Die Spannung des Sprays wurde auf 4,0 kV gesetzt, der

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Sheathgas-Fluss lag bei 30 arb, die Kapillartemperatur bei 230 °C und die Kapillarspannung bei 40 V. Pro Messung wurden je 4 µL einer 50 µM DNA-Lösung injiziert.

Tabelle 5.13: Gradienteneinstellung der HPLC-Pumpe.

Zeit [min]	Anteil (B) [%]
0	10
25	90
35	90
40	10
45	10

5.4 Auswertung der proteolytischen MS und MS/MS-Daten des cPAK

5.4.1 Automatisierte Auswertung mittels PEAKS

Die automatisierte Auswertung der generierten MS und MS/MS-Daten des proteolytisch gespaltenen cPAK wurde mit Hilfe der Software PEAKS 8.0 von Bioinformatics Solutions durchgeführt. Die Enzyme mit den spezifischen Schnittstellen waren in der Software integriert bzw. wurden nachträglich manuell eingefügt (Thermolysin, LysN). Für die Datenbank-Suche wurde eine FASTA-Datei erstellt, in der die von ALDEVRON bestimmte Sequenz des cPAK, die Sequenzen aller verwendeten Enzyme, die von humanem Keratin, der hauptsächlich durch die Probenvorbereitung eingebrachten Verunreinigung, sowie die von BRÜGGEMANN et al. bestimmte Sequenz der schweren Kette eines Ratten-IgG2a aus der UniProt-Datenbank (Q5M842) enthalten sind. Eine Änderung der Glycosylierungssequenz für die Proben, die mit PNGase F behandelt wurden (N → D) ist nicht notwendig, da die erweiterten Suchalgorithmen *PEAKS PTM* und *Spider* diese Umwandlung automatisch als Mutation bzw. PTM (Deamidierung) erkennen.

Tabelle 5.14: Parameter und Einstellungen der verschiedenen Suchalgorithmen von PEAKS.

„Create Project“ + „Data Refinement“	
Enzymes	Specific for each sample (CT, GluC, LysN, LysC, TL, Trypsin)
Ionization	Nano-ESI
Instrument	FT-ICR-MS
Fragment	CID
MS Precursor Scan	FT-ICR
MS/MS Product Ion Scan	Iontrap
Precursor Mass Search Type	Monoisotopic
Correct Precursor	Mass only

5. EXPERIMENTELLER TEIL

„Identification“ + „DeNovo“	
Datenbank	Eigene Datenbank (s. Anhang) UniProt/Swiss-Prot
Parent Mass Error Tolerance	15 ppm
Fragment Mass Error Tolerance	0,3 Da
Missed Cleavages	3
Non-specific Cleavages	1
Fixed Modifications	Carbamidomethyl (@ C)
Variable Modifications	Oxidation (@ M), Deamidation (@ N,Q)
Variable PTM per Peptide	3
FDR with Decoy-fusion	< 1%
„PTM“ + „Spider“	
Available Modifications	485 built-in Modifications (s. Anhang)
DeNovo ALC score	> 15 %

5.4.2 Manuelle Auswertung der (de)glycosylierten Peptide

Da es bei PEAKS keine direkte Funktion gab um auf die Glycopeptide zuzugreifen und die vielfältigen Strukturen aufzulisten, wurde die Auswertung manuell mit Hilfe von Xcalibur 2.2 durchgeführt. Dabei wurde gezielt nach den Peptiden gesucht, die als deglycosylierte Variante in den verschiedenen proteolytischen Ansätzen aller Enzyme gefunden wurden. Auf Basis der mittels MALDI-MS detektierten Zuckerstrukturen wurde nach allen fucosylierten und unfucosylierten Strukturen mit und ohne *bisecting* GlcNAc gesucht. Als Kriterium für die richtige Zuordnung wurde die Existenz mindestens zweier unterschiedlicher Ladungszustände der entsprechenden Glycopeptide bei gleicher Retentionszeit im Chromatogramm verwendet. Falls nur ein Ladungszustand identifiziert wurde, wurde darauf geachtet, dass die Intensität mindestens 10-fach höher lag als der Untergrund. Des Weiteren sollte die Abweichung von der theoretischen Masse bei weniger als 5 ppm liegen. Als zusätzliches Indiz galt die Existenz von Oxoniumionen, die aus der Fragmentation der Zucker resultieren können (GlcNAc-Hexose = 366,14; GlcNAc = 204,09).

6. Literatur

- [1] M. Baker; Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies, *Nature*, **2015**, 521, 274-276.
- [2] B. Liedert, D. Pluim, J. Schellens, J. Thomale; Adduct-specific monoclonal antibodies for the measurement of cisplatin-induced DNA lesions in individual cell nuclei, *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, e47.
- [3] World Health Organization (WHO), *Cancer fact sheet N°297*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, 18-01-2016
- [4] World Health Organization (WHO), *GLOBOCAN 2012*, http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx#, 18-01-2016
- [5] D.-Y. Lu, T.-R. Lu, H.-Y. Wu; Personalized cancer therapy: a perspective, *Clinical & Experimental Pharmacology*, **2014**, 2014.
- [6] Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), *Chemotherapie*, <https://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/chemotherapie.php>, 19-01-2016
- [7] W. Hiddemann, C. R. Bartram, *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie; Teil 2: Solide Tumoren - Lymphome - Leukämien*, Springer Berlin Heidelberg, **2009**.
- [8] G. T. Studio, K. Aktories, U. Förstermann, F. B. Hofmann, K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Elsevier Health Sciences Germany, **2011**.
- [9] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas; Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode, *Nature*, **1965**, 205, 698-699.
- [10] B. Rosenberg, L. Vancamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour; Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents, *Nature*, **1969**, 222, 385-386.
- [11] B. Lippert, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley, **1999**.
- [12] Q. E. Wang, K. Milum, C. H. Han, Y. W. Huang, G. Wani, J. Thomale, A. A. Wani; Differential contributory roles of nucleotide excision and homologous recombination repair for enhancing cisplatin sensitivity in human ovarian cancer cells, *Molecular Cancer*, **2011**, 10, 24.
- [13] M. J. Piccart, J. Abrams, P. F. Dodion, N. Crespeigne, J. P. Sculier, J. C. Pector, C. Finet, C. Nouwijnck, H. Bondue, G. Atassi, Y. Kenis; Intraperitoneal Chemotherapy With Cisplatin and Melphalan, *Journal of the National Cancer Institute*, **1988**, 80, 1118-1124.
- [14] D. B. Longley, D. P. Harkin, P. G. Johnston; 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nat Rev Cancer*, **2003**, 3, 330-338.
- [15] K. R. Hande; Topoisomerase II inhibitors, *Update on Cancer Therapeutics*, **2008**, 3, 13-26.
- [16] R. E. Kast, K. F. Foley; Cancer chemotherapy and cachexia: mirtazapine and olanzapine are 5-HT₃ antagonists with good antinausea effects, *European Journal of Cancer Care*, **2007**, 16, 351-354.
- [17] D. Wang, S. J. Lippard; Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat Rev Drug Discov*, **2005**, 4, 307-320.
- [18] C. C. K. Chao; Decreased accumulation as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in cervix carcinoma HeLa cells: relation to DNA repair, *Mol. Pharmacol.*, **1994**, 45, 1137-1144.
- [19] D. Garcia Sar, M. Montes-Bayon, E. Blanco Gonzalez, L. M. Sierra Zapico, A. Sanz-Medel; Reduction of cisplatin-induced nephrotoxicity in vivo by selenomethionine: the effect on cisplatin-DNA adducts, *Chem. Res. Toxicol.*, **2011**, 24, 896-904.
- [20] N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, R. Oun; The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials, *Dalton Trans*, **2010**, 39, 8113-8127.
- [21] C. A. Rabik, M. E. Dolan; Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents, *Cancer treatment reviews*, **2007**, 33, 9-23.
- [22] S. Mowaka, M. Linscheid; Separation and characterization of oxaliplatin dinucleotides from DNA using HPLC-ESI ion trap mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 392, 819-830.
- [23] M. M. Gottesman; Mechanisms of Cancer Drug Resistance, *Annual Review of Medicine*, **2002**, 53, 615-627.

6. LITERATUR

- [24] D. S. Alberts, P. Y. Liu, E. V. Hannigan, R. O'Toole, S. D. Williams, J. A. Young, E. W. Franklin, D. L. Clarke-Pearson, V. K. Malviya, B. DuBeshter, M. D. Adelson, W. J. Hoskins; Intraperitoneal Cisplatin plus Intravenous Cyclophosphamide versus Intravenous Cisplatin plus Intravenous Cyclophosphamide for Stage III Ovarian Cancer, *New England Journal of Medicine*, **1996**, 335, 1950-1955.
- [25] E. Espinosa, J. Feliu, P. Zamora, M. G. Barón, J. Sanchez, A. Ordonez, J. Espinosa; Serum albumin and other prognostic factors related to response and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, **1995**, 12, 67-76.
- [26] A. I. Ivanov, J. Christodoulou, J. A. Parkinson, K. J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, P. J. Sadler; Cisplatin Binding Sites on Human Albumin, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 14721-14730.
- [27] S. Ishida, J. Lee, D. J. Thiele, I. Herskowitz; Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, 99, 14298-14302.
- [28] Y. Kasherman, S. Sturup, D. Gibson; Is glutathione the major cellular target of cisplatin? A study of the interactions of cisplatin with cancer cell extracts, *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 4319-4328.
- [29] A. Basu, S. Krishnamurthy; Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage, *J Nucleic Acids*, **2010**, 2010.
- [30] W. Voigt, A. Dietrich, H.-J. Schmoll; Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz, *Pharmazie in unserer Zeit*, **2006**, 35, 134-143.
- [31] A. M. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. H. den Hartog, P. H. Lohman, J. Reedijk; Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation, *Biochemistry*, **1985**, 24, 707-713.
- [32] N. Hadjiladis, E. Sletten, *Metal Complex - DNA Interactions*, Wiley, **2009**.
- [33] G. N. Rudd, J. A. Hartley, R. L. Souhami; Persistence of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinking in peripheral blood mononuclear cells from elderly and young individuals, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 35, 323-326.
- [34] N. Poklar, D. S. Pilch, S. J. Lippard, E. A. Redding, S. U. Dunham, K. J. Breslauer; Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability, and energetics of a 20-mer DNA duplex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1996**, 93, 7606-7611.
- [35] C. J. Van Garderen, L. P. A. Van Houte; The Solution Structure of a DNA Duplex Containing the cis -Pt(NH₃)₂[d(-GTG)-N 7(G), N 7(G)] Adduct, as Determined with High-Field NMR and Molecular Mechanics/Dynamics, *Eur. J. Biochem.*, **1994**, 225, 1169-1179.
- [36] P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard; Crystal Structure of the Anticancer Drug Cisplatin Bound to Duplex DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 12309-12321.
- [37] E. R. Jamieson, S. J. Lippard; Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2467-2498.
- [38] R. C. Todd, S. J. Lippard; Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds, *Metallomics*, **2009**, 1, 280-291.
- [39] R. S. Cole; Repair of DNA Containing Interstrand Crosslinks in Escherichia coli: Sequential Excision and Recombination, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1973**, 70, 1064-1068.
- [40] L. J. Niedernhofer, H. Odijk, M. Budzowska, E. van Drunen, A. Maas, A. F. Theil, J. de Wit, N. Jaspers, H. B. Beverloo, J. H. Hoeijmakers; The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks, *Molecular and cellular biology*, **2004**, 24, 5776-5787.
- [41] M. Ziehe, *Untersuchungen zur Komplexität und Dynamik von Cisplatin-DNA-Addukten*, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, **2012**.
- [42] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, P. Walter, M. Raff, K. Roberts, *Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition*, Routledge, **2002**.
- [43] P. Grasso, *Essentials of Pathology for Toxicologists*, CRC Press, **2003**.
- [44] R. Medzhitov; Toll-like receptors and innate immunity, *Nat Rev Immunol*, **2001**, 1, 135-145.
- [45] M. A. Armant, M. J. Fenton; Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals, *Genome Biology*, **2002**, 3, reviews3011.3011-reviews3011.3016.
- [46] C. Schütt, B. Broeker, *Grundwissen Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, **2009**.

6. LITERATUR

- [47] J. Sprent; Antigen-Presenting Cells: Professionals and amateurs, *Current Biology*, **1995**, *5*, 1095-1097.
- [48] L. Deng, M. Luo, A. Velikovsky, R. A. Mariuzza; Structural Insights into the Evolution of the Adaptive Immune System, *Annual Review of Biophysics*, **2013**, *42*, 191-215.
- [49] J. E. Smith-Garvin, G. A. Koretzky, M. S. Jordan; T Cell Activation, *Annual review of immunology*, **2009**, *27*, 591-619.
- [50] C. Yee, J. A. Thompson, D. Byrd, S. R. Riddell, P. Roche, E. Celis, P. D. Greenberg; Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, *99*, 16168-16173.
- [51] T. Manzo, H. E. Heslop, C. M. Rooney; Antigen-specific T cell therapies for cancer, *Human Molecular Genetics*, **2015**, *24*, R67-R73.
- [52] J. Zhu, W. E. Paul; CD4 T cells: fates, functions, and faults, *Blood*, **2008**, *112*, 1557-1569.
- [53] M. S. Neuberger, K. J. Patel, P. Dariavach, K. Nelms, C. J. G. Peaker, G. T. Williams; The Mouse B-Cell Antigen Receptor: Definition and Assembly of the Core Receptor of the Five Immunoglobulin Isotypes, *Immunological Reviews*, **1993**, *132*, 147-162.
- [54] D. Corcos, M. J. Osborn, L. S. Matheson; B-cell receptors and heavy chain diseases: guilty by association?, *Blood*, **2011**, *117*, 6991-6998.
- [55] T. W. LeBien, T. F. Tedder; B lymphocytes: how they develop and function, *Blood*, **2008**, *112*, 1570-1580.
- [56] M. D. Cooper; The early history of B cells, *Nat Rev Immunol*, **2015**, *15*, 191-197.
- [57] S. L. Nutt, P. D. Hodgkin, D. M. Tarlinton, L. M. Corcoran; The generation of antibody-secreting plasma cells, *Nat Rev Immunol*, **2015**, *15*, 160-171.
- [58] T. Honjo, S. Habu; Origin of Immune Diversity: Genetic Variation and Selection, *Annu. Rev. Biochem*, **1985**, *54*, 803-830.
- [59] L. J. Fanning, A. M. Connor, G. E. Wu; Development of the Immunoglobulin Repertoire, *Clinical immunology and immunopathology*, **1996**, *79*, 1-14.
- [60] S. Tonegawa; Somatic generation of antibody diversity, *Nature*, **1983**, *302*, 575-581.
- [61] E. Market, F. N. Papavasiliou; V(D)J Recombination and the Evolution of the Adaptive Immune System, *PLoS Biol*, **2003**, *1*, e16.
- [62] V. H. Odegard, D. G. Schatz; Targeting of somatic hypermutation, *Nat Rev Immunol*, **2006**, *6*, 573-583.
- [63] J. Stavnezer, C. T. Amemiya; Evolution of isotype switching, *Seminars in Immunology*, **2004**, *16*, 257-275.
- [64] T. Kurosaki, K. Kometani, W. Ise; Memory B cells, *Nat Rev Immunol*, **2015**, *15*, 149-159.
- [65] A. F. Ochsenbein, D. D. Pinschewer, S. Sierro, E. Horvath, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel; Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, 13263-13268.
- [66] S. Riedel; Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination, *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, **2005**, *18*, 21-25.
- [67] M. Lombard, P. Pastoret, A. Moulin; A brief history of vaccines and vaccination, *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, **2007**, *26*, 29-48.
- [68] S. P. Hart, J. R. Smith, I. Dransfield; Phagocytosis of opsonized apoptotic cells: roles for 'old-fashioned' receptors for antibody and complement, *Clin. Exp. Immunol.*, **2004**, *135*, 181-185.
- [69] G. Löffler, *Basiswissen Biochemie: Mit Pathobiochemie*, Springer London, Limited, **2008**.
- [70] R. S. Flannagan, V. Jaumouillé, S. Grinstein; The Cell Biology of Phagocytosis, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **2012**, *7*, 61-98.
- [71] M. Noris, G. Remuzzi; Overview of Complement Activation and Regulation, *Seminars in Nephrology*, **2013**, *33*, 479-492.
- [72] N. S. Merle, S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi, L. T. Roumenina; Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation, *Frontiers in Immunology*, **2015**, *6*, 262.

6. LITERATUR

- [73] N. S. Merle, R. Noe, L. Halbwachs-Mecarelli, V. Fremeaux-Bacchi, L. T. Roumenina; Complement system part II: role in immunity, *Frontiers in Immunology*, **2015**, 6.
- [74] W. H. Organization; Nomenclature for Human Immunoglobulins, *Bulletin of the World Health Organization*, **1964**, 30, 447-450.
- [75] E. A. Padlan; Anatomy of the antibody molecule, *Molecular Immunology*, **1994**, 31, 169-217.
- [76] S. V. Kaveri, G. J. Silverman, J. Bayry; Natural IgM in Immune Equilibrium and Harnessing Their Therapeutic Potential, *The Journal of Immunology*, **2012**, 188, 939-945.
- [77] B. Frangione, C. Milstein, J. R. L. Pink; Immunoglobulins: Structural Studies of Immunoglobulin G, *Nature*, **1969**, 221, 145-148.
- [78] M. W. Steward, *Antibodies, Their Structure and Function*, Chapman and Hall, **1984**.
- [79] H. M. Grey, J. W. Hirst, M. Cohn; A New Mouse Immunoglobulin: IgG3, *The Journal of Experimental Medicine*, **1971**, 133, 289-304.
- [80] M. Potter; Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice, *Physiological Reviews*, **1972**, 52, 631-719.
- [81] G. Vidarsson, G. Dekkers, T. Rispen; IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions, *Frontiers in Immunology*, **2014**, 5, 520.
- [82] F. R. Seiler, P. Gronski, R. Kurrle, G. Lüben, H.-P. Harthus, W. Ax, K. Bosslet, H.-G. Schwick; Monoklonale Antikörper: Chemie, Funktion und Anwendungsmöglichkeiten, *Angew. Chem.*, **1985**, 97, 141-163.
- [83] S. Cohen, C. Milstein; Structure of Antibody Molecules, *Nature*, **1967**, 214, 449-541.
- [84] T. M. Dillon, M. S. Ricci, C. Vezina, G. C. Flynn, Y. D. Liu, D. S. Rehder, M. Plant, B. Henkle, Y. Li, S. Deechongkit, B. Varnum, J. Wypych, A. Balland, P. V. Bondarenko; Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass, *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 16206-16215.
- [85] J. Wypych, M. Li, A. Guo, Z. Zhang, T. Martinez, M. J. Allen, S. Fodor, D. N. Kelner, G. C. Flynn, Y. D. Liu, P. V. Bondarenko, M. S. Ricci, T. M. Dillon, A. Balland; Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms, *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 16194-16205.
- [86] A. J. Killard, B. Deasy, R. O'Kennedy, M. R. Smyth; Antibodies: production, functions and applications in biosensors, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **1995**, 14, 257-266.
- [87] N. I. o. S. a. T. (NIST), *NIST Develops NMR 'Fingerprinting' for Monoclonal Antibodies*, <http://www.nist.gov/mml/bmd/nmr-fingerprinting.cfm>, 08-02-2016
- [88] P. Bork, L. Holm, C. Sander; The Immunoglobulin Fold: Structural Classification, Sequence Patterns and Common Core, *J. Mol. Biol.*, **1994**, 242, 309-320.
- [89] J. V. Ravetch, J.-P. Kinet; Fc receptors, *Annual review of immunology*, **1991**, 9, 457-492.
- [90] X. Zhu, G. Meng, B. L. Dickinson, X. Li, E. Mizoguchi, L. Miao, Y. Wang, C. Robert, B. Wu, P. D. Smith, W. I. Lencer, R. S. Blumberg; MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG Is Functionally Expressed in Monocytes, Intestinal Macrophages, and Dendritic Cells, *The Journal of Immunology*, **2001**, 166, 3266-3276.
- [91] M. Allhorn, A. I. Olin, F. Nimmerjahn, M. Collin; Human IgG/Fc gamma R Interactions Are Modulated by Streptococcal IgG Glycan Hydrolysis, *PLoS One*, **2008**, 3, 12.
- [92] L. Hood, W. R. Gray, B. G. Sanders, W. J. Dreyer; Light Chain Evolution, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **1967**, 32, 133-146.
- [93] S. Cohen, S. Gordon; Dissociation of kappa- and lambda-chains from reduced human immunoglobulins, *Biochem. J.*, **1965**, 97, 460-465.
- [94] Abe, Goto, Kosaka, Wolfenbarger, Weiss, Solomon; Differences in kappa to lambda ($\kappa:\lambda$) ratios of serum and urinary free light chains, *Clinical & Experimental Immunology*, **1998**, 111, 457-462.
- [95] C. Chothia, A. M. Lesk; Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, *J. Mol. Biol.*, **1987**, 196, 901-917.
- [96] C. Chothia, A. M. Lesk, A. Tramontano, M. Levitt, S. J. Smith-Gill, G. Air, S. Sheriff, E. A. Padlan, D. Davies, W. R. Tulip, et al.; Conformations of immunoglobulin hypervariable regions, *Nature*, **1989**, 342, 877-883.

6. LITERATUR

- [97] K. L. Bennett, S. V. Smith, R. J. W. Truscott, M. M. Sheil; Monitoring Papain Digestion of a Monoclonal Antibody by Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.*, **1997**, *245*, 17-27.
- [98] S. M. Andrew, J. A. Titus, in *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
- [99] A. Hauk; Der Unterschied zwischen mono- und polyklonalen Antikörpern, *Biologie in unserer Zeit*, **2014**, *44*, 156-156.
- [100] G. Köhler, C. Milstein; Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, **1975**, *256*, 495-497.
- [101] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, B. Häcker, A. Held, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, **2007**.
- [102] P. Shepherd, C. J. Dean, *Monoclonal antibodies: A practical approach*, Oxford University Press, **2000**.
- [103] S. J. McKenzie, J. F. Halsey; Cholera toxin B subunit as a carrier protein to stimulate a mucosal immune response, *The Journal of Immunology*, **1984**, *133*, 1818-1824.
- [104] L. Riechmann, M. Clark, H. Waldmann, G. Winter; Reshaping human antibodies for therapy, *Nature*, **1988**, *332*, 323-327.
- [105] P. J. Hudson, C. Souriau; Engineered antibodies, *Nat Med*, **2003**, *9*, 129-134.
- [106] N. Lonberg, D. Huszar; Human Antibodies from Transgenic Mice, *International Reviews of Immunology*, **1995**, *13*, 65-93.
- [107] U. Schmitz, A. Versmold, P. Kaufmann, H. G. Frank; Phage Display: A Molecular Tool for the Generation of Antibodies— A Review, *Placenta*, **2000**, *21*, Supplement A, S106-S112.
- [108] M. Mann, O. N. Jensen; Proteomic analysis of post-translational modifications, *Nat Biotech*, **2003**, *21*, 255-261.
- [109] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, Jr.; Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2005**, *44*, 7342-7372.
- [110] L. K. Hmiel, K. A. Brorson, M. T. Boyne, 2nd; Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity, *Anal Bioanal Chem*, **2015**, *407*, 79-94.
- [111] G. Walsh, R. Jefferis; Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins, *Nat. Biotechnol.*, **2006**, *24*, 1241-1252.
- [112] B. Yan, J. Valliere-Douglass, L. Brady, S. Steen, M. Han, D. Pace, S. Elliott, Z. Yates, Y. Han, A. Balland, W. Wang, D. Pettit; Analysis of post-translational modifications in recombinant monoclonal antibody IgG1 by reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1164*, 153-161.
- [113] C. Chumsae, G. Gaza-Bulsecu, J. Sun, H. Liu; Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody, *J. Chromatogr. B*, **2007**, *850*, 285-294.
- [114] H. S. Gadgil, P. V. Bondarenko, G. D. Pipes, T. M. Dillon, D. Banks, J. Abel, G. R. Kleemann, M. J. Treuheit; Identification of cysteinylolation of a free cysteine in the Fab region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody using Lys-C limited proteolysis coupled with LC/MS analysis, *Anal. Biochem.*, **2006**, *355*, 165-174.
- [115] A. Wright, S. L. Morrison; Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering, *Trends Biotechnol.*, **1997**, *15*, 26-32.
- [116] A. Beck, E. Wagner-Rousset, M. C. Bussat, M. Lokteff, C. Klinguer-Hamour, J. F. Haeuw, L. Goetsch, T. Wurch, A. Van Dorsselaer, N. Corvaia; Trends in Glycosylation, Glycoanalysis and Glycoengineering of Therapeutic Antibodies and Fc-Fusion Proteins, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2008**, *9*, 482-501.
- [117] P. V. d. Steen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker; Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **1998**, *33*, 151-208.
- [118] E. Maverakis, K. Kim, M. Shimoda, M. E. Gershwin, F. Patel, R. Wilken, S. Raychaudhuri, L. R. Ruhaak, C. B. Lebrilla; Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review, *Journal of Autoimmunity*, **2015**, *57*, 1-13.
- [119] L. W. Guddat, J. N. Herron, A. B. Edmundson; Three-dimensional structure of a human immunoglobulin with a hinge deletion, *Proc Natl Acad Sci USA*, **1993**, *90*, 4271-4275.

6. LITERATUR

- [120] H. W. Schroeder Jr, L. Cavacini; Structure and function of immunoglobulins, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2010**, 125, S41-S52.
- [121] R. Huber; Spatial structure of immunoglobulin molecules, *Klin Wochenschr*, **1980**, 58, 1217-1231.
- [122] W. Wang, S. Singh, D. L. Zeng, K. King, S. Nema; Antibody structure, instability, and formulation, *J. Pharm. Sci.*, **2007**, 96, 1-26.
- [123] J. V. Ravetch, J. P. Kinet; Fc receptors, *Annual review of immunology*, **1991**, 9, 457-492.
- [124] Y. Mimura, S. Church, R. Ghirlando, P. R. Ashton, S. Dong, M. Goodall, J. Lund, R. Jefferis; The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms, *Molecular Immunology*, **2000**, 37, 697-706.
- [125] S. Krapp, Y. Mimura, R. Jefferis, R. Huber, P. Sondermann; Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity, *J. Mol. Biol.*, **2003**, 325, 979-989.
- [126] M. J. Feige, S. Nath, S. R. Catharino, D. Weinfurtner, S. Steinbacher, J. Buchner; Structure of the Murine Unglycosylated IgG1 Fc Fragment, *J. Mol. Biol.*, **2009**, 391, 599-608.
- [127] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, T. Xiang, C. Chumsae; Structural effect of deglycosylation and methionine oxidation on a recombinant monoclonal antibody, *Molecular Immunology*, **2008**, 45, 701-708.
- [128] R. F. Latypov, S. Hogan, H. Lau, H. Gadgil, D. Liu; Elucidation of acid-induced unfolding and aggregation of human immunoglobulin IgG1 and IgG2 Fc, *J. Biol. Chem.*, **2012**, 287, 1381-1396.
- [129] R. Jefferis; Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics, *Nat Rev Drug Discov*, **2009**, 8, 226-234.
- [130] A. Varki; Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution, *American Journal of Physical Anthropology*, **2001**, 116, 54-69.
- [131] R. Jefferis; Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics, *Biotechnol. Progr.*, **2005**, 21, 11-16.
- [132] M. Weitzhandler, M. Hardy, M. S. Co, N. Avdalovic; Analysis of carbohydrates on IgG preparations, *J. Pharm. Sci.*, **1994**, 83, 1670-1675.
- [133] M. Wuhrer, J. C. Stam, F. E. van de Geijn, C. A. Koeleman, C. T. Verrips, R. J. Dolhain, C. H. Hokke, A. M. Deelder; Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum, *Proteomics*, **2007**, 7, 4070-4081.
- [134] T. Taniguchi, T. Mizuochi, M. Beale, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, A. Kobata; Structures of the sugar chains of rabbit immunoglobulin G: occurrence of asparagine-linked sugar chains in Fab fragment, *Biochemistry*, **1985**, 24, 5551-5557.
- [135] R. B. Parekh, R. A. Dwek, B. J. Sutton, D. L. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, T. W. Rademacher, T. Mizuochi, T. Taniguchi, K. Matsuta, F. Takeuchi, Y. Nagano, T. Miyamoto, A. Kobata; Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG, *Nature*, **1985**, 316, 452-457.
- [136] G. Galfre, C. Milstein, B. Wright; Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG, *Nature*, **1979**, 277, 131-133.
- [137] M. J. Tilby, C. Johnson, R. J. Knox, J. Cordell, J. J. Roberts, C. J. Dean; Sensitive detection of DNA modifications induced by cisplatin and carboplatin in vitro and in vivo using a monoclonal antibody, *Cancer Res.*, **1991**, 51, 123-129.
- [138] W. I. Sundquist, S. J. Lippard, B. D. Stollar; Monoclonal antibodies to DNA modified with cis- or trans-diamminedichloroplatinum(II), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1987**, 84, 8225-8229.
- [139] D. Barnes, G. Sato; Methods for growth of cultured cells in serum-free medium, *Anal. Biochem.*, **1980**, 102, 255-270.
- [140] W. Barcellini, M. O. Borghi, C. Fain, N. Del Papa, F. Nicoletti, P. L. Meroni; Enrichment of IgG anti-DNA-producing lymphoblastoid cell lines by antigen-coated immunomagnetic beads, *Clinical immunology and immunopathology*, **1992**, 65, 39-44.

6. LITERATUR

- [141] C. C. K. Chao, T.-C. Shieh, H. Huang; Use of a monoclonal antibody to detect DNA damage caused by the anticancer drug cis-diamminedichloroplatinum (II) in vivo and in vitro, *FEBS Lett.*, **1994**, 354, 103-109.
- [142] J. P. Thomas, J. Lautermann, B. Liedert, F. Seiler, J. Thomale; High Accumulation of Platinum-DNA Adducts in Strial Marginal Cells of the Cochlea Is an Early Event in Cisplatin but Not Carboplatin Ototoxicity, *Mol. Pharmacol.*, **2006**, 70, 23-29.
- [143] A. E. Fenske, S. Glaesener, C. Bokemeyer, J. Thomale, J. Dahm-Daphi, F. Honecker, D. C. Dartsch; Cisplatin resistance induced in germ cell tumour cells is due to reduced susceptibility towards cell death but not to altered DNA damage induction or repair, *Cancer Letters*, **2012**, 324, 171-178.
- [144] H. Bazin, A. Beckers, P. Querinjean; Three classes and four (sub)classes of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, *European Journal of Immunology*, **1974**, 4, 44-48.
- [145] H. Bazin, L. M. Xhurdebise, G. Burtonboy, A. M. Lebacqz, L. De Clercq, F. Cormont; Rat monoclonal antibodies. I. Rapid purification from in vitro culture supernatants, *J Immunol Methods*, **1984**, 66, 261-269.
- [146] R. S. Nezlin, T. I. Vengerova, O. V. Rokhlin, H. K. G. Machulla; Allotypic marker of kappa light chains of rat immunoglobulins localized in the constant region of the chain, *Immunochemistry*, **1974**, 11, 517-518.
- [147] M. Brüggemann; Evolution of the rat immunoglobulin gamma heavy-chain gene family, *Gene*, **1988**, 74, 473-482.
- [148] M. Brüggemann, J. Free, A. Diamond, J. Howard, S. Cobbold, H. Waldmann; Immunoglobulin heavy chain locus of the rat: striking homology to mouse antibody genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1986**, 83, 6075-6079.
- [149] H. Bazin, *Rat Hybridomas and Rat Monoclonal Antibodies*, Taylor & Francis, **1990**.
- [150] H. Bazin, C. Deckers, A. Beckers, J. F. Heremans; Transplantable immunoglobulin-secreting tumours in rats. I. General features of LOU/Ws1 strain rat immunocytomas and their monoclonal proteins, *International Journal of Cancer*, **1972**, 10, 568-580.
- [151] J. Rousseaux, H. Bazin, G. Biserte; Differences in sensitivity to reduction of rat immunoglobulin IgG subclasses, *FEBS Lett.*, **1979**, 98, 359-362.
- [152] R. S. Nezlin, M. Y. Krilov, O. V. Rokhlin; Different susceptibility of subclasses of rat IgG2 to tryptic digestion, *Immunochemistry*, **1973**, 10, 651-652.
- [153] J. Rousseaux, R. Rousseaux-Prevost, H. Bazin, G. Biserte; Tryptic cleavage of rat IgG: A comparative study between subclasses, *Immunology letters*, **1981**, 3, 93-98.
- [154] T. S. Raju, J. B. Briggs, S. M. Borge, A. J. Jones; Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics, *Glycobiology*, **2000**, 10, 477-486.
- [155] Aldevron, *Antibody Sequencing Service*, <http://www.aldevron.com/services/antibody-development>, 23-11-2016
- [156] M. Brüggemann, P. Delmastro-Galfre, H. Waldmann, F. Calabi; Sequence of a rat immunoglobulin gamma 2c heavy chain constant region cDNA: extensive homology to mouse gamma 3, *Eur J Immunol*, **1988**, 18, 317-319.
- [157] J. M. Coco-Martin, J. W. Oberink, F. Brunink, T. A. M. Van Der Velden-De Groot, E. C. Beuvery; Instability of a Hybridoma Cell Line in a Homogeneous Continuous Perfusion Culture System, *Hybridoma*, **1992**, 11, 653-665.
- [158] J. H. Gross, K. Beifuss, *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*, Springer Berlin Heidelberg, **2012**.
- [159] M. Karas, F. Hillenkamp; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299-2301.
- [160] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo; Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2, 151-153.
- [161] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse; Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, **1989**, 246, 64-71.

6. LITERATUR

- [162] P. Arpino; Combined liquid chromatography mass spectrometry. Part I. Coupling by means of a moving belt interface, *Mass Spectrom. Rev.*, **1989**, *8*, 35-55.
- [163] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice; Molecular Beams of Macroions, *The Journal of Chemical Physics*, **1968**, *49*, 2240-2249.
- [164] J. V. Iribarne, B. A. Thomson; On the evaporation of small ions from charged droplets, *The Journal of Chemical Physics*, **1976**, *64*, 2287-2294.
- [165] J. Fernandez de la Mora; Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *406*, 93-104.
- [166] M. Wilm, M. Mann; Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source, *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 1-8.
- [167] M. Karas, U. Bahr, T. Dülcks; Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **2000**, *366*, 669-676.
- [168] M. Sharawy, S. Consta; How do non-covalent complexes dissociate in droplets? A case study of the desolvation of dsDNA from a charged aqueous nanodrop, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2015**, *17*, 25550-25562.
- [169] G. T. Gibson, S. M. Mugo, R. D. Oleschuk; Nanoelectrospray emitters: trends and perspective, *Mass Spectrom. Rev.*, **2009**, *28*, 918-936.
- [170] M. Karas, M. Gluckmann, J. Schafer; Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors, *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 1-12.
- [171] R. Aebersold, D. R. Goodlett; Mass Spectrometry in Proteomics, *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 269-296.
- [172] S. Sauer; The essence of DNA sample preparation for MALDI mass spectrometry, *J. Biochem. Bioph. Methods*, **2007**, *70*, 311-318.
- [173] D. J. Harvey; Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update for 2011-2012, *Mass Spectrom. Rev.*, **2015**.
- [174] T. S. Raju, R. E. Jordan; Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies, *mAbs*, **2012**, *4*, 385-391.
- [175] Y. Peng, X. Xu; Detection of sialylated N-Linked glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, **2014**, *19*, 245-252.
- [176] W. Morelle, J.-C. Michalski; Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry, *Nat. Protocols*, **2007**, *2*, 1585-1602.
- [177] L. Signor, E. Boeri Erba; Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometric Analysis of Intact Proteins Larger than 100 kDa, *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, **2013**, 50635.
- [178] R. E. March, J. F. J. Todd, *Quadrupole ion trap mass spectrometry*, J. Wiley, Hoboken, N.J., **2005**.
- [179] M. B. Comisarow, A. G. Marshall; Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, **1974**, *25*, 282-283.
- [180] S. Eliuk, A. Makarov; Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation, *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, **2015**, *8*, 61-80.
- [181] M. Scigelova, M. Hornshaw, A. Giannakopoulos, A. Makarov; Fourier Transform Mass Spectrometry, *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, **2011**, *10*, M111.009431.
- [182] M. J. Kailemia, L. R. Ruhaak, C. B. Lebrilla, I. J. Amster; Oligosaccharide analysis by mass spectrometry: a review of recent developments, *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, 196-212.
- [183] S. Schurch; Characterization of nucleic acids by tandem mass spectrometry - The second decade (2004-2013): From DNA to RNA and modified sequences, *Mass Spectrom. Rev.*, **2014**.
- [184] J. Mitchell Wells, S. A. McLuckey, in *Methods Enzymol.*, Vol. Volume 402, Academic Press, **2005**, 148-185.
- [185] D. P. Little, J. P. Speir, M. W. Senko, P. B. O'Connor, F. W. McLafferty; Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing, *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 2809-2815.

6. LITERATUR

- [186] R. A. Zubarev, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty; Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 3265-3266.
- [187] P. Roepstorff, J. Fohlman; Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomedical mass spectrometry*, **1984**, *11*, 601.
- [188] B. Domon, C. E. Costello; A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate J.*, **1988**, *5*, 397-409.
- [189] D. J. Harvey; Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates, *Mass Spectrom. Rev.*, **1999**, *18*, 349-450.
- [190] L. P. Brüll, V. Kováčik, J. E. Thomas-Oates, W. Heerma, J. Haverkamp; Sodium-cationized oligosaccharides do not appear to undergo 'internal residue loss' rearrangement processes on tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, *12*, 1520-1532.
- [191] Y. Zhang, B. R. Fonslow, B. Shan, M.-C. Baek, J. R. Yates III; Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics, *Chem. Rev.*, **2013**, *113*, 2343-2394.
- [192] B. Thiede, W. Höhenwarter, A. Krah, J. Mattow, M. Schmid, F. Schmidt, P. R. Jungblut; Peptide mass fingerprinting, *Methods*, **2005**, *35*, 237-247.
- [193] J. K. Eng, A. L. McCormack, J. R. Yates; An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **1994**, *5*, 976-989.
- [194] D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell; Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis*, **1999**, *20*, 3551-3567.
- [195] T. Koenig, B. H. Menze, M. Kirchner, F. Monigatti, K. C. Parker, T. Patterson, J. J. Steen, F. A. Hamprecht, H. Steen; Robust Prediction of the MASCOT Score for an Improved Quality Assessment in Mass Spectrometric Proteomics, *Journal of Proteome Research*, **2008**, *7*, 3708-3717.
- [196] N. Bandeira, K. R. Clauser, P. A. Pevzner; Shotgun Protein Sequencing: Assembly of Peptide Tandem Mass Spectra from Mixtures of Modified Proteins, *Mol. Cell. Proteomics*, **2007**, *6*, 1123-1134.
- [197] A. Armirotti, G. Damonte; Achievements and perspectives of top-down proteomics, *Proteomics*, **2010**, *10*, 3566-3576.
- [198] J. C. Tran, L. Zamdborg, D. R. Ahlf, J. E. Lee, A. D. Catherman, K. R. Durbin, J. D. Tipton, A. Vellaichamy, J. F. Kellie, M. Li, C. Wu, S. M. Sweet, B. P. Early, N. Siuti, R. D. LeDuc, P. D. Compton, P. M. Thomas, N. L. Kelleher; Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics, *Nature*, **2011**, *480*, 254-258.
- [199] A. J. Heck; Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology, *Nat Methods*, **2008**, *5*, 927-933.
- [200] J. A. Loo; Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes, *Int. J. Mass spectrom.*, **2000**, *200*, 175-186.
- [201] A. Schmidt, U. Bahr, M. Karas; Influence of pressure in the first pumping stage on analyte desolvation and fragmentation in nano-ESI MS, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 6040-6046.
- [202] I. V. Chernushevich, B. A. Thomson; Collisional Cooling of Large Ions in Electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 1754-1760.
- [203] F. Sobott, H. Hernández, M. G. McCammon, M. A. Tito, C. V. Robinson; A Tandem Mass Spectrometer for Improved Transmission and Analysis of Large Macromolecular Assemblies, *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 1402-1407.
- [204] A. R. McKay, B. T. Ruotolo, L. L. Ilag, C. V. Robinson; Mass measurements of increased accuracy resolve heterogeneous populations of intact ribosomes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 11433-11442.
- [205] R. H. H. van den Heuvel, E. van Duijn, H. Mazon, S. A. Synowsky, K. Lorenzen, C. Versluis, S. J. J. Brouns, D. Langridge, J. van der Oost, J. Hoyes, A. J. R. Heck; Improving the performance of a quadrupole time-of-flight instrument for macromolecular mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 7473-7483.

6. LITERATUR

- [206] R. J. Rose, E. Damoc, E. Denisov, A. Makarov, A. J. R. Heck; High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies, *Nat Meth*, **2012**, 9, 1084-1086.
- [207] A. L. J, A. B. S, J. Zhang; Integrating Native Mass Spectrometry and Top-Down MS for Defining Protein Interactions Important in Biology and Medicine, *Mass Spectrom (Tokyo)*, **2013**, 2, S0013.
- [208] N. J. Thompson, S. Rosati, R. J. Rose, A. J. Heck; The impact of mass spectrometry on the study of intact antibodies: from post-translational modifications to structural analysis, *Chem Commun (Camb)*, **2013**, 49, 538-548.
- [209] N. J. Thompson, S. Rosati, A. J. Heck; Performing native mass spectrometry analysis on therapeutic antibodies, *Methods*, **2014**, 65, 11-17.
- [210] Z. Zhang, H. Pan, X. Chen; Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies, *Mass Spectrom. Rev.*, **2009**, 28, 147-176.
- [211] M. A. Tito, J. Miller, N. Walker, K. F. Griffin, E. D. Williamson, D. Despeyroux-Hill, R. W. Titball, C. V. Robinson; Probing Molecular Interactions in Intact Antibody: Antigen Complexes, an Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry Approach, *Biophys. J.*, **2001**, 81, 3503-3509.
- [212] X. Lu, M. R. DeFelippis, L. Huang; Linear epitope mapping by native mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **2009**, 395, 100-107.
- [213] A. Dyachenko, G. Wang, M. Belov, A. Makarov, R. N. de Jong, E. T. van den Bremer, P. W. Parren, A. J. Heck; Tandem Native Mass-Spectrometry on Antibody-Drug Conjugates and Submillion Da Antibody-Antigen Protein Assemblies on an Orbitrap EMR Equipped with a High-Mass Quadrupole Mass Selector, *Anal. Chem.*, **2015**, 87, 6095-6102.
- [214] A. G. Ferrige, M. J. Seddon, S. Jarvis, J. Skilling, R. Aplin; Maximum entropy deconvolution in electrospray mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1991**, 5, 374-377.
- [215] A. G. Ferrige, M. J. Seddon, B. N. Green, S. A. Jarvis, J. Skilling, J. Staunton; Disentangling electrospray spectra with maximum entropy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6, 707-711.
- [216] A. Beck, T. Wurch, C. Bailly, N. Corvaia; Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies, *Nat Rev Immunol*, **2010**, 10, 345-352.
- [217] N. A. P. S. Buss, S. J. Henderson, M. McFarlane, J. M. Shenton, L. de Haan; Monoclonal antibody therapeutics: history and future, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2012**, 12, 615-622.
- [218] Y. J. Bang, E. Van Cutsem, A. Feyereislova, H. C. Chung, L. Shen, A. Sawaki, F. Lordick, A. Ohtsu, Y. Omuro, T. Satoh, G. Aprile, E. Kulikov, J. Hill, M. Lehle, J. Ruschoff, Y. K. Kang; Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial, *Lancet (London, England)*, **2010**, 376, 687-697.
- [219] S. Balduzzi, S. Mantarro, V. Guarneri, L. Tagliabue, V. Pistotti, L. Moja, R. D'Amico; Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2014**.
- [220] Y. V. Kovtun, V. S. Goldmacher; Cell killing by antibody–drug conjugates, *Cancer Letters*, **2007**, 255, 232-240.
- [221] P. M. LoRusso, D. Weiss, E. Guardino, S. Girish, M. X. Sliwkowski; Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **2011**, 17, 6437-6447.
- [222] A. C. Moser, D. S. Hage; Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments, *Bioanalysis*, **2010**, 2, 769-790.
- [223] Z. Zhang, X. Hu, Q. Zhang, P. Li; Determination for multiple mycotoxins in agricultural products using HPLC-MS/MS via a multiple antibody immunoaffinity column, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **2016**, 1021, 145-152.
- [224] B. K. Van Weemen, A. H. W. M. Schuurs; Immunoassay using antigen—enzyme conjugates, *FEBS Lett.*, **1971**, 15, 232-236.

6. LITERATUR

- [225] R. M. Lequin; Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Clin. Chem.*, **2005**, *51*, 2415-2418.
- [226] S. Vira, E. Mekhedov, G. Humphrey, P. S. Blank; Fluorescent labeled antibodies - balancing functionality and degree of labeling, *Anal. Biochem.*, **2010**, *402*, 146-150.
- [227] J. Duraiyan, R. Govindarajan, K. Kaliyappan, M. Palanisamy; Applications of immunohistochemistry, *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, **2012**, *4*, S307-S309.
- [228] L. Waentig, N. Jakubowski, S. Hardt, C. Scheler, P. H. Roos, M. W. Linscheid; Comparison of different chelates for lanthanide labeling of antibodies and application in a Western blot immunoassay combined with detection by laser ablation (LA-)ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2012**, *27*, 1311-1320.
- [229] L. Waentig, P. H. Roos, N. Jakubowski; Labelling of antibodies and detection by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry : PART III. Optimization of antibody labelling for application in a Western blot procedure, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2009**, *24*, 924.
- [230] C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne; Multiplexed Immunohistochemical Detection of Tumor Markers in Breast Cancer Tissue Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 8177-8183.
- [231] K. L. Holmes, L. M. Lantz, W. Russ; Conjugation of fluorochromes to monoclonal antibodies, *Current Protocols in Cytometry*, **2001**, *4.2*, 1-4.2. 12.
- [232] A. H. El-Khatib, D. Esteban-Fernandez, M. W. Linscheid; Dual labeling of biomolecules using MeCAT and DOTA derivatives: application to quantitative proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, *403*, 2255-2267.
- [233] R. Singh, E. K. Maloney; Labeling of antibodies by in situ modification of thiol groups generated from selenol-catalyzed reduction of native disulfide bonds, *Anal. Biochem.*, **2002**, *304*, 147-156.
- [234] G. Schwarz, L. Mueller, S. Beck, M. W. Linscheid; DOTA based metal labels for protein quantification: a review, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2014**, *29*, 221-233.
- [235] P. K. Qasba, E. Boeggeman, B. Ramakrishnan; Site-Specific Linking of Biomolecules via Glycan Residues Using Glycosyltransferases, *Biotechnol. Progr.*, **2008**, *24*, 520-526.
- [236] P. K. Qasba; Glycans of Antibodies as a Specific Site for Drug Conjugation Using Glycosyltransferases, *Bioconjug Chem*, **2015**, *26*, 2170-2175.
- [237] B. M. Zeglis, C. B. Davis, D. Abdel-Atti, S. D. Carlin, A. Chen, R. Aggeler, B. J. Agnew, J. S. Lewis; Chemoenzymatic Strategy for the Synthesis of Site-Specifically Labeled Immunoconjugates for Multimodal PET and Optical Imaging, *Bioconjugate Chem.*, **2014**, *25*, 2123-2128.
- [238] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi; Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, *104*, 16793-16797.
- [239] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi; Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6974-6998.
- [240] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi; Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 3688-3690.
- [241] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianferani; Characterization of therapeutic antibodies and related products, *Anal. Chem.*, **2013**, *85*, 715-736.
- [242] S. Koren, M. Kosmac, A. Colja Venturini, S. Montanic, V. Curin Serbec; Antibody variable-region sequencing as a method for hybridoma cell-line authentication, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, *78*, 1071-1078.
- [243] N. Fischer; Sequencing antibody repertoires: The next generation, *mAbs*, **2011**, *3*, 17-20.
- [244] L. Garibyan, N. Avashia; Polymerase Chain Reaction, *Journal of Investigative Dermatology*, **2013**, *133*, 1-4.
- [245] V. Pham, W. J. Henzel, D. Arnott, S. Hymowitz, W. N. Sandoval, B. T. Truong, H. Lowman, J. R. Lill; De novo proteomic sequencing of a monoclonal antibody raised against OX40 ligand, *Anal. Biochem.*, **2006**, *352*, 77-86.

6. LITERATUR

- [246] E. Sousa, S. Olland, H. H. Shih, K. Marquette, R. Martone, Z. Lu, J. Paulsen, D. Gill, T. He; Primary sequence determination of a monoclonal antibody against α -synuclein using a novel mass spectrometry-based approach, *Int. J. Mass spectrom.*, **2012**, *312*, 61-69.
- [247] L. Tsiatsiani, A. J. Heck; Proteomics beyond trypsin, *FEBS J*, **2015**, *282*, 2612-2626.
- [248] P. Fang, M. Liu, Y. Xue, J. Yao, Y. Zhang, H. Shen, P. Yang; Controlling nonspecific trypsin cleavages in LC-MS/MS-based shotgun proteomics using optimized experimental conditions, *Analyst*, **2015**, *140*, 7613-7621.
- [249] N. Colaert, H. Barsnes, M. Vaudel, K. Helsens, E. Timmerman, A. Sickmann, K. Gevaert, L. Martens; thermo-msf-parser: An Open Source Java Library to Parse and Visualize Thermo Proteome Discoverer msf Files, *Journal of Proteome Research*, **2011**, *10*, 3840-3843.
- [250] J. M. Burkhardt, C. Schumbrutski, S. Wortelkamp, A. Sickmann, R. P. Zahedi; Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics, *J. Proteomics*, **2012**, *75*, 1454-1462.
- [251] L. Xin, B. Shan; Integrating de novo Sequencing and Database Search for Monoclonal Antibody Sequencing, *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, **2013**, *24*, S62-S63.
- [252] B. Ma, K. Zhang, C. Hendrie, C. Liang, M. Li, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie; PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, *17*, 2337-2342.
- [253] J. Zhang, L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, W. Zhang, Z. Zhang, G. A. Lajoie, B. Ma; PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification, *Mol Cell Proteomics*, **2012**, *11*, M111 010587.
- [254] Y. Han, B. Ma, K. Zhang; SPIDER: software for protein identification from sequence tags with de novo sequencing error, *J Bioinform Comput Biol*, **2005**, *3*, 697-716.
- [255] H. Choi, A. I. Nesvizhskii; False discovery rates and related statistical concepts in mass spectrometry-based proteomics, *Journal of proteome research*, **2007**, *7*, 47-50.
- [256] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, C. Chumsae, A. Newby-Kew; Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE, *Biotechnol. Lett*, **2007**, *29*, 1611-1622.
- [257] P. N. Boyd, A. C. Lines, A. K. Patel; The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H, *Molecular Immunology*, **1995**, *32*, 1311-1318.
- [258] R. Reverberi, L. Reverberi; Factors affecting the antigen-antibody reaction, *Blood Transfusion*, **2007**, *5*, 227-240.
- [259] C. J. Van Oss; Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding, *Molecular Immunology*, **1995**, *32*, 199-211.
- [260] M. Vazquez-Rey, D. A. Lang; Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes, *Biotechnol. Bioeng.*, **2011**, *108*, 1494-1508.
- [261] L. Mouls, J.-L. Aubagnac, J. Martinez, C. Enjalbal; Low Energy Peptide Fragmentations in an ESI-Q-ToF Type Mass Spectrometer, *Journal of Proteome Research*, **2007**, *6*, 1378-1391.
- [262] R. K. Brummitt, D. P. Nesta, L. Chang, A. M. Kroetsch, C. J. Roberts; Nonnative aggregation of an IgG1 antibody in acidic conditions, part 2: nucleation and growth kinetics with competing growth mechanisms, *J. Pharm. Sci.*, **2011**, *100*, 2104-2119.
- [263] P. Lössl, J. Snijder, A. J. R. Heck; Boundaries of Mass Resolution in Native Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **2014**, *25*, 906-917.
- [264] J. Liu, M. D. H. Nguyen, J. D. Andya, S. J. Shire; Reversible Self-Association Increases the Viscosity of a Concentrated Monoclonal Antibody in Aqueous Solution, *J. Pharm. Sci.*, **2005**, *94*, 1928-1940.
- [265] J. K. Wright, J. Tschopp, J. C. Jaton; Preparation and characterization of chemically defined oligomers of rabbit immunoglobulin G molecules for the complement binding studies, *Biochem. J*, **1980**, *187*, 767-774.
- [266] B. L. Schwartz, K. J. Light-Wahl, R. D. Smith; Observation of noncovalent complexes to the avidin tetramer by electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **1994**, *5*, 201-204.

6. LITERATUR

- [267] J. Ding, R. J. Andereg; Specific and nonspecific dimer formation in the electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **1995**, *6*, 159-164.
- [268] A. McAuley, J. Jacob, C. G. Kolvenbach, K. Westland, H. J. Lee, S. R. Brych, D. Rehder, G. R. Kleemann, D. N. Brems, M. Matsumura; Contributions of a disulfide bond to the structure, stability, and dimerization of human IgG1 antibody C(H)3 domain, *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, **2008**, *17*, 95-106.
- [269] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, E. Lundell; Assessment of antibody fragmentation by reversed-phase liquid chromatography and mass spectrometry, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **2008**, *876*, 13-23.
- [270] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, J. Sun; Characterization of the stability of a fully human monoclonal IgG after prolonged incubation at elevated temperature, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **2006**, *837*, 35-43.
- [271] P. Liu, B. W. O'Mara, B. M. Warrack, W. Wu, Y. Huang, Y. Zhang, R. Zhao, M. Lin, M. S. Ackerman, P. K. Hocknell, G. Chen, L. Tao, S. Rieble, J. Wang, D. B. Wang-Iverson, A. A. Tymiak, M. J. Grace, R. J. Russell; A Tris (2-Carboxyethyl) Phosphine (TCEP) Related Cleavage on Cysteine-Containing Proteins, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **2010**, *21*, 837-844.
- [272] S. L. Cohen, C. Price, J. Vlasak; β -Elimination and Peptide Bond Hydrolysis: Two Distinct Mechanisms of Human IgG1 Hinge Fragmentation upon Storage, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 6976-6977.
- [273] J. Vlasak, R. Ionescu; Fragmentation of monoclonal antibodies, *mAbs*, **2011**, *3*, 253-263.
- [274] L. A. Breci, D. L. Tabb, J. R. Yates, V. H. Wysocki; Cleavage N-Terminal to Proline: Analysis of a Database of Peptide Tandem Mass Spectra, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 1963-1971.
- [275] E. A. Kapp, F. Schutz, G. E. Reid, J. S. Eddes, R. L. Moritz, R. A. O'Hair, T. P. Speed, R. J. Simpson; Mining a tandem mass spectrometry database to determine the trends and global factors influencing peptide fragmentation, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 6251-6264.
- [276] J. Zhang, R. R. Ogorzalek Loo, J. A. Loo; Increasing Fragmentation of Disulfide-Bonded Proteins for Top-Down Mass Spectrometry by Supercharging, *Int. J. Mass spectrom.*, **2015**, *377*, 546-556.
- [277] T. Naven, D. Harvey; Effect of structure on the signal strength of oligosaccharides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry on time-of-flight and magnetic sector instruments, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, *10*, 1361-1366.
- [278] J. Siemiątkowski, Y. Lyubarskaya, D. Houde, S. Tep, R. Mhatre; A comparison of three techniques for quantitative carbohydrate analysis used in characterization of therapeutic antibodies, *Carbohydr. Res.*, **2006**, *341*, 410-419.
- [279] T. Shinkawa, K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, K. Uchida, H. Anazawa, M. Satoh, M. Yamasaki, N. Hanai, K. Shitara; The Absence of Fucose but Not the Presence of Galactose or Bisecting N-Acetylglucosamine of Human IgG1 Complex-type Oligosaccharides Shows the Critical Role of Enhancing Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 3466-3473.
- [280] R. Abès, J.-L. Teillaud; Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG, *Pharmaceuticals*, **2010**, *3*, 146.
- [281] S. Ma, W. Nashabeh; Carbohydrate Analysis of a Chimeric Recombinant Monoclonal Antibody by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 5185-5192.
- [282] F. Fritze, *Beiträge zur Charakterisierung der N-Glycosylierungsstelle eines CisPt-DNA-spezifischen Antikörpers mittels Massenspektrometrie*, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, **2014**.
- [283] K. Hooper, M. Rosenblatt, M. Urh, S. Saveliev, C. Hosfield, G. Kobs, M. Ford, R. Jones, R. Amunugama, D. Allen, R. Brazas; Alternative Enzymes Lead to Improvements in Sequence Coverage and PTM Analysis, *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, **2013**, *24*, S52-S52.
- [284] T. A. Khan, S. Friedensohn, A. R. Gorter de Vries, J. Straszewski, H.-J. Ruscheweyh, S. T. Reddy; Accurate and predictive antibody repertoire profiling by molecular amplification fingerprinting, *Science Advances*, **2016**, *2*.

6. LITERATUR

- [285] D. J. Kroon, A. Baldwin-Ferro, P. Lalan; Identification of Sites of Degradation in a Therapeutic Monoclonal Antibody by Peptide Mapping, *Pharm. Res.*, **1992**, 9, 1386-1393.
- [286] M.-I. Aguilar, *HPLC of Peptides and Proteins*, Springer, **2004**.
- [287] E. S. Boja, H. M. Fales; Overalkylation of a protein digest with iodoacetamide, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 3576-3582.
- [288] E. Gianazza, J. Crawford, I. Miller; Detecting oxidative post-translational modifications in proteins, *Amino Acids*, **2007**, 33, 51-56.
- [289] J. Lengqvist, H. Eriksson, M. Gry, K. Uhlén, C. Björklund, B. Bjellqvist, P.-J. Jakobsson, J. Lehtiö; Observed peptide pI and retention time shifts as a result of post-translational modifications in multidimensional separations using narrow-range IPG-IEF, *Amino Acids*, **2011**, 40, 697-711.
- [290] N. E. Robinson; Protein deamidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, 99, 5283-5288.
- [291] H. Zhang, R. Y. C. Huang, P. R. Jalili, J. W. Irungu, G. R. Nicol, K. B. Ray, H. W. Rohrs, M. L. Gross; Improved mass spectrometric characterization of protein glycosylation reveals unusual glycosylation of maize-derived bovine trypsin, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 10095-10101.
- [292] L. Kollipara, R. P. Zahedi; Protein carbamylation: In vivo modification or in vitro artefact?, *Proteomics*, **2013**, 13, 941-944.
- [293] R. Raijmakers, P. Neerincx, S. Mohammed, A. J. R. Heck; Cleavage specificities of the brother and sister proteases Lys-C and Lys-N, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 8827-8829.
- [294] K. Morihara, H. Tsuzuki; Thermolysin: Kinetic Study with Oligopeptides, *Eur. J. Biochem.*, **1970**, 15, 374-380.
- [295] S. E. Winston, S. A. Fuller, M. J. Eveleigh, J. G. Hurrell; Conjugation of enzymes to antibodies, *Current protocols in molecular biology*, **2001**, Chapter 11, Unit11.11.
- [296] J. E. Berlier, A. Rothe, G. Buller, J. Bradford, D. R. Gray, B. J. Filanoski, W. G. Telford, S. Yue, J. Liu, C.-Y. Cheung; Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **2003**, 51, 1699-1712.
- [297] E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno; Enzyme-Labeling of Antibodies and Their Fragments for Enzyme Immunoassay and Immunohistochemical Staining, *Journal of Immunoassay*, **1983**, 4, 209-327.
- [298] M. Monici, in *Biotechnology Annual Review, Vol. Volume 11*, Elsevier, **2005**, 227-256.
- [299] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann; Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels, *Nat Meth*, **2008**, 5, 763-775.
- [300] O. Ornatsky, V. I. Baranov, D. R. Bandura, S. D. Tanner, J. Dick; Multiple cellular antigen detection by ICP-MS, *J. Immunol. Methods*, **2006**, 308, 68-76.
- [301] P. H. Roos, A. Venkatachalam, A. Manz, L. Waentig, C. U. Koehler, N. Jakubowski; Detection of electrophoretically separated cytochromes P450 by element-labelled monoclonal antibodies via laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, **2008**, 392, 1135-1147.
- [302] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless; Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2001**, 40, 2004-2021.
- [303] M. E. Martin, S. G. Parameswarappa, M. S. O'Dorisio, F. C. Pigge, M. K. Schultz; A DOTA-peptide conjugate by copper-free click chemistry, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 4805-4807.
- [304] M. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. J. Dirks, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft; Bioconjugation with Strained Alkenes and Alkynes, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 805-815.
- [305] P. Wan, S. Culshaw, K. Yates; Photohydration of aromatic alkenes and alkynes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 2509-2515.
- [306] C. Becker, *Markierung von alpha-Crystallin via Click-Chemie und dessen Analytik mittels Massenspektrometrie*, Bachelorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, **2014**.
- [307] F. Rosu, S. Pirotte, E. De Pauw, V. Gabelica; Positive and negative ion mode ESI-MS and MS/MS for studying drug-DNA complexes, *Int. J. Mass spectrom.*, **2006**, 253, 156-171.
- [308] R. Gupta, A. Kapur, J. L. Beck, M. M. Sheil; Positive ion electrospray ionization mass spectrometry of double-stranded DNA/drug complexes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 15, 2472-2480.

6. LITERATUR

- [309] J. Temsamani, M. Kubert, S. Agrawal; Sequence identity of the n-1 product of a synthetic oligonucleotide, *Nucleic Acids Res.*, **1995**, *23*, 1841-1844.
- [310] J. Hofmann, *Beiträge zur Charakterisierung von Antikörper-Antigen-Komplexen eines Cisplatin-spezifischen monoklonalen Antikörpers*, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, **2012**.
- [311] B. H. Zimm, S. D. Levene; Problems and prospects in the theory of gel electrophoresis of DNA, *Quarterly Reviews of Biophysics*, **2009**, *25*, 171-204.
- [312] C. Atmanene, E. Wagner-Rousset, M. Malissard, B. Chol, A. Robert, N. Corvaia, A. V. Dorsselaer, A. Beck, S. Sanglier-Cianféroni; Extending Mass Spectrometry Contribution to Therapeutic Monoclonal Antibody Lead Optimization: Characterization of Immune Complexes Using Noncovalent ESI-MS, *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 6364-6373.
- [313] M. Oda, S. Uchiyama, M. Noda, Y. Nishi, M. Koga, K. Mayanagi, C. V. Robinson, K. Fukui, Y. Kobayashi, K. Morikawa, T. Azuma; Effects of antibody affinity and antigen valence on molecular forms of immune complexes, *Molecular Immunology*, **2009**, *47*, 357-364.
- [314] S. Rosati, R. J. Rose, N. J. Thompson, E. van Duijn, E. Damoc, E. Denisov, A. Makarov, A. J. Heck; Exploring an orbitrap analyzer for the characterization of intact antibodies by native mass spectrometry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2012**, *51*, 12992-12996.
- [315] K. Hollemeyer, E. Heinzle, A. Tholey; Identification of oxidized methionine residues in peptides containing two methionine residues by derivatization and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Proteomics*, **2002**, *2*, 1524-1531.
- [316] M. Ziehe, D. Esteban-Fernandez, U. Hochkirch, J. Thomale, M. W. Linscheid; On the complexity and dynamics of in vivo Cisplatin-DNA adduct formation using HPLC/ICP-MS, *Metallomics*, **2012**, *4*, 1098-1104.
- [317] N. J. Baumhover, M. E. Martin, S. G. Parameswarappa, K. C. Kloepping, M. S. O'Dorisio, F. C. Pigge, M. K. Schultz; Improved synthesis and biological evaluation of chelator-modified α -MSH analogs prepared by copper-free click chemistry, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 5757-5761.
- [318] U. K. Laemmli; Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **1970**, *227*, 680-685.
- [319] T. S. Meyer, B. L. Lamberts; Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips, *Biochim. Biophys. Acta*, **1965**, *107*, 144-145.
- [320] B. J. Bassam, P. M. Gresshoff; Silver staining DNA in polyacrylamide gels, *Nat Protoc*, **2007**, *2*, 2649-2654.
- [321] H. Schägger, G. Vonjagow; Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.*, **1987**, *166*, 368-379.
- [322] H. Schägger; Tricine-SDS-PAGE, *Nat. Protoc.*, **2006**, *1*, 16-22.
- [323] J. Klose, U. Kobalz; Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis*, **1995**, *16*, 1034-1059.

7. Anhang

7.1 Ergänzende Spektren und Abbildungen

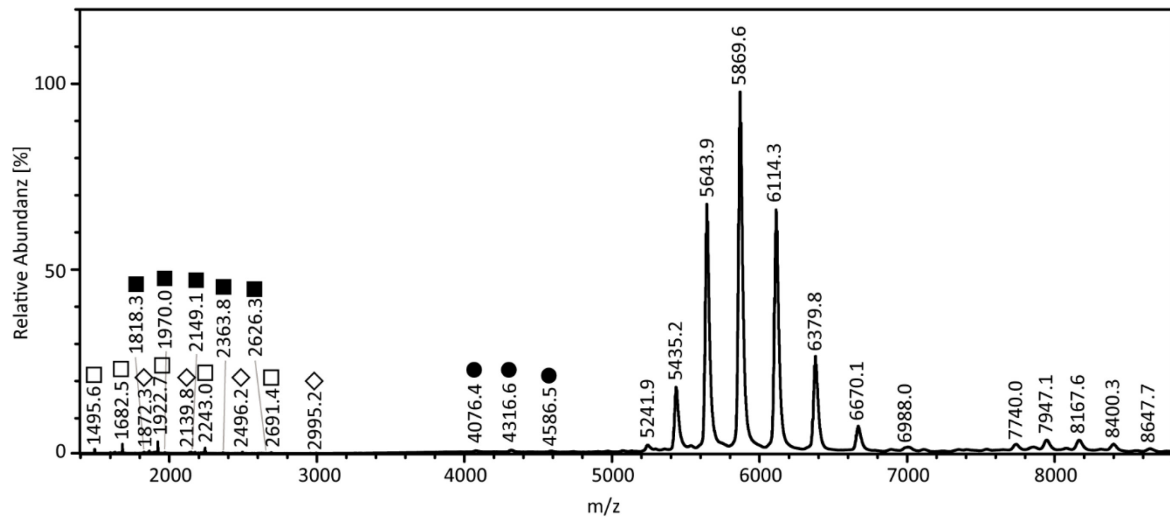


Abbildung 7.1: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des cPAK ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in 200 mM AmAc) bei einer KE von 100 eV .

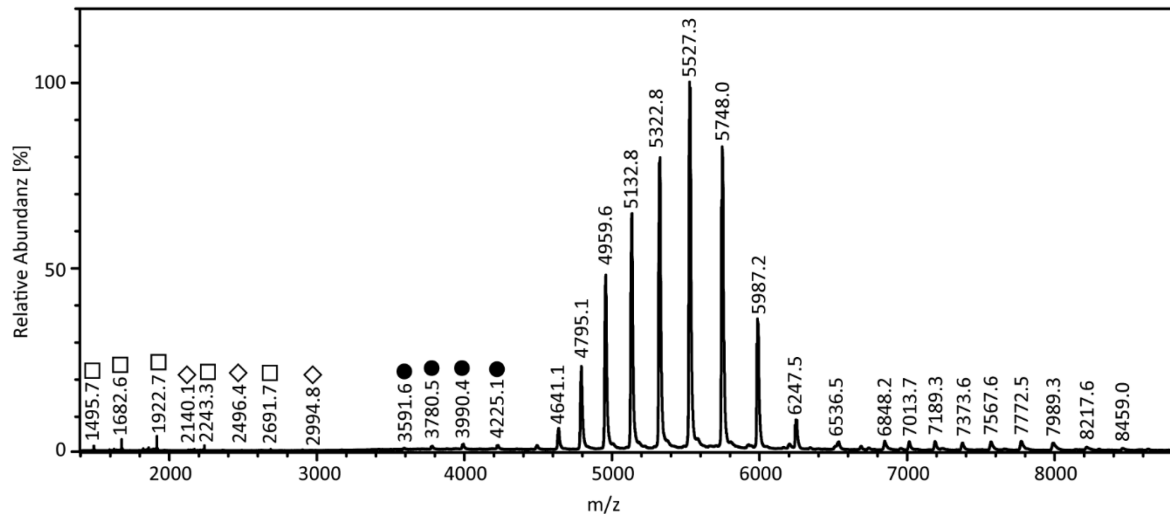


Abbildung 7.2: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des mittels PNGase F deglycosylierten cPAK ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in 200 mM AmAc) bei einer KE von 100 eV .

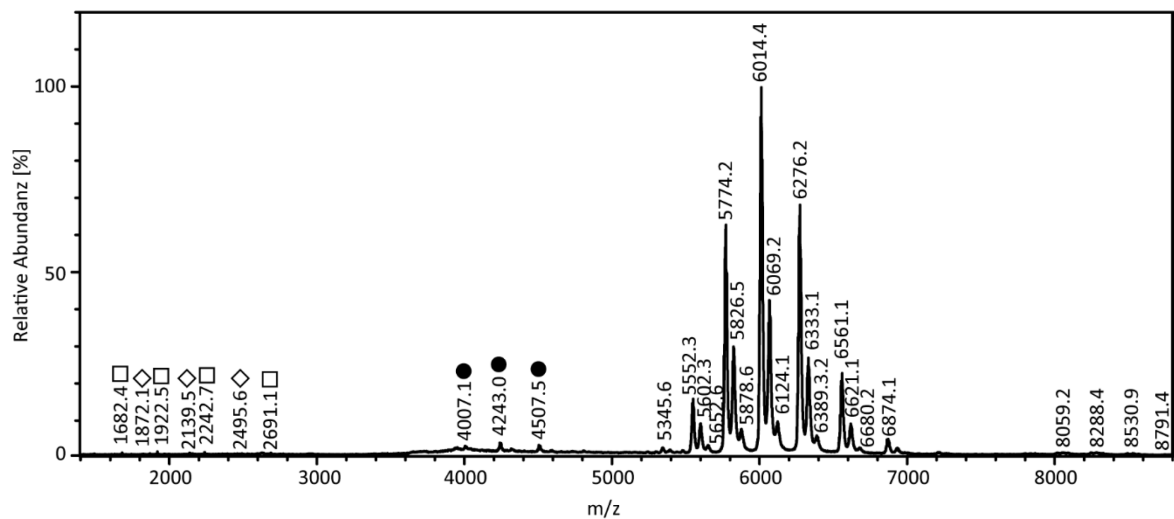


Abbildung 7.3: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des mittels Endo S deglycosylierten cPAK ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in 200 mM AmAc) bei einer KE von 100 eV .

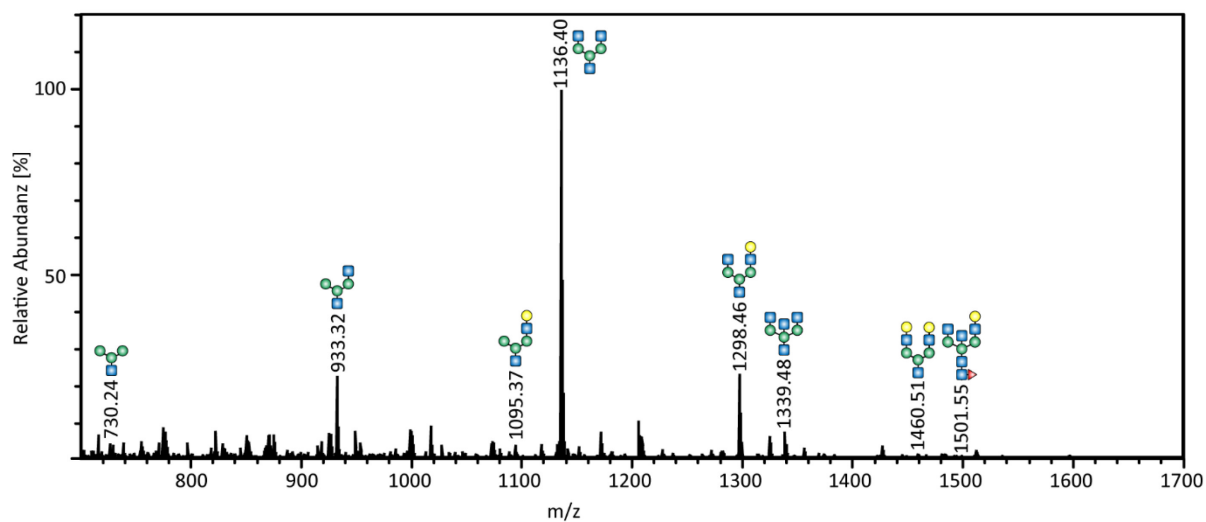


Abbildung 7.4: MALDI-Massenspektrum der mittels Endo S abgespaltenen N-glycosidisch gebundenen Zucker ($c \approx 10 \text{ } \mu\text{M}$) in einer $10 \text{ mg/mL DHB-Matrix (H}_2\text{O/ACN 50:50 (v/v))}$.

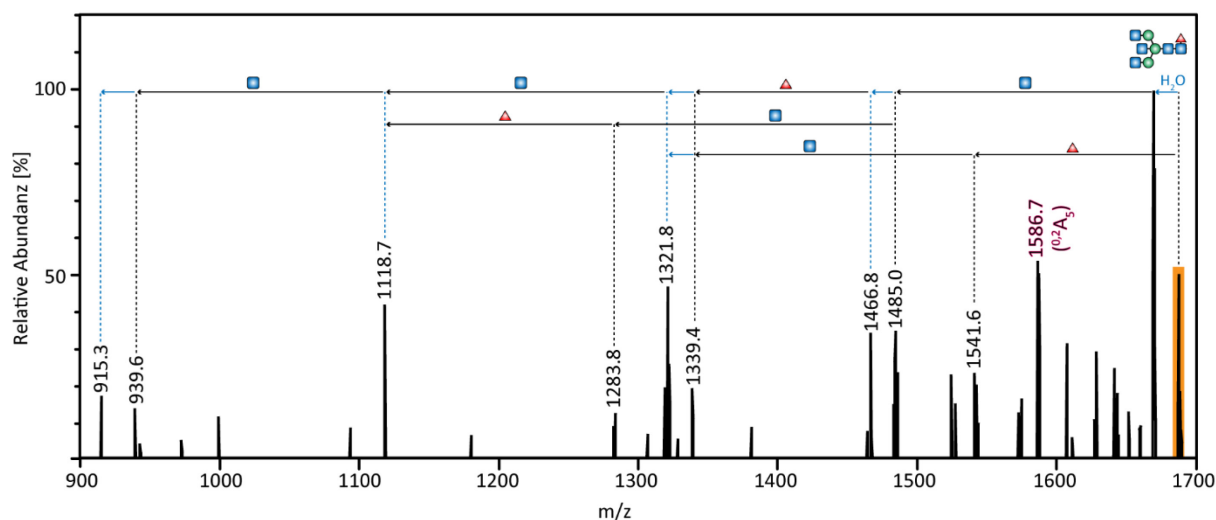


Abbildung 7.5: MALDI-MS/MS-Spektrum der Fragmentierung des intensivsten Ions der G0Fgn-Struktur bei einer relativen KE von 35 %. Die Z- oder B-Fragmente werden durch blaue, die Y- oder C-Fragmente durch schwarze gepunktete Linien markiert. Blaue Pfeile symbolisieren den Verlust von Wasser bzw. den Unterschied zwischen Y/Z-Fragmenten und B/C-Fragmenten.

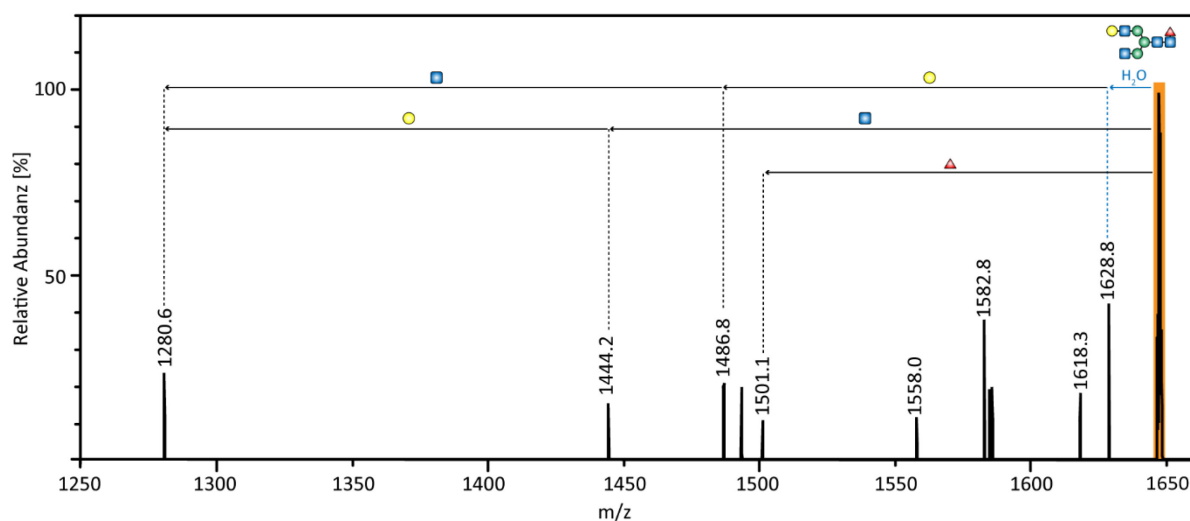


Abbildung 7.6: MALDI-MS/MS-Spektrum der Fragmentierung des intensivsten Ions der G1F-Struktur bei einer relativen KE von 35 %. Die Z- oder B-Fragmente werden durch blaue, die Y- oder C-Fragmente durch schwarze gepunktete Linien markiert. Blaue Pfeile symbolisieren den Verlust von Wasser bzw. den Unterschied zwischen Y/Z-Fragmenten und B/C-Fragmenten.

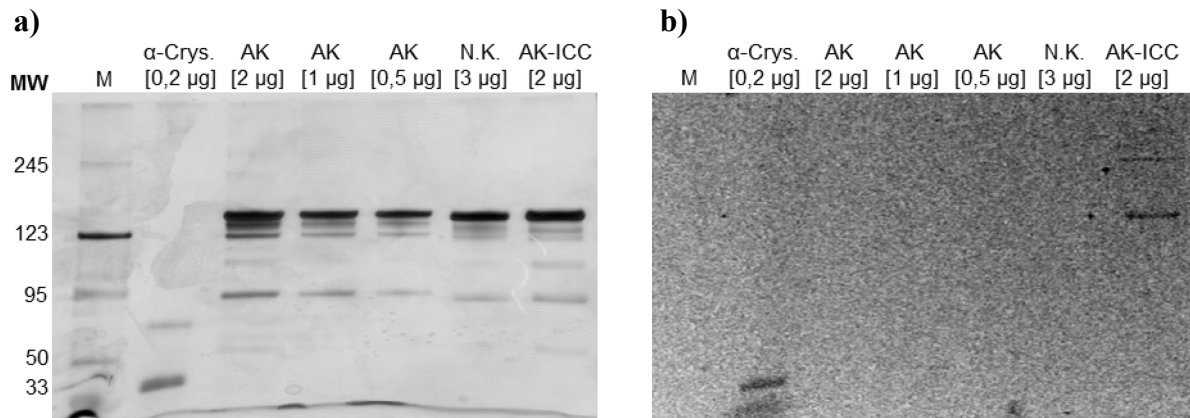


Abbildung 7.7: 15 %-iges nicht-reduzierendes Tricin-SDS-Gel verschiedener Mengen des mit ICC-DIBO markierten Antikörpers (AK_{ICC}) und der Negativkontrolle (N.K.). **a)** Silberfärbung **b)** Färbung mit SYBR® Gold. Das Fluoreszenzemissionsbild wurde invertiert ($\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$).

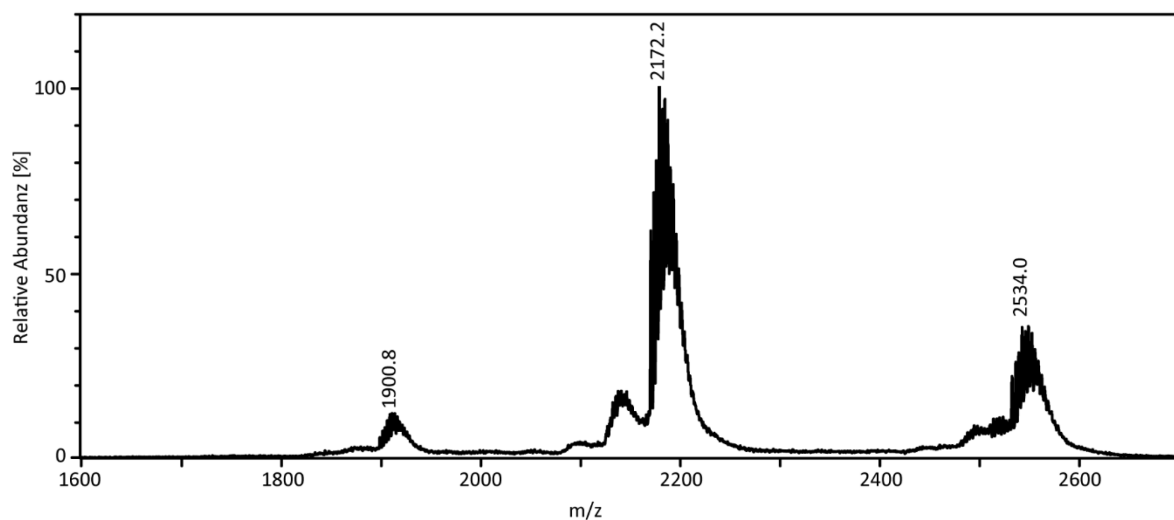


Abbildung 7.8: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des ss12 (c = 10 µM in 200 mM NH₄OAc) bei positiver Ionisation und einer KE von 40 eV. Die Signale sind weniger stark geladen als bei negativer Ionisation, zudem wird eine höhere Konzentration benötigt, um intensive Signale zu erhalten.

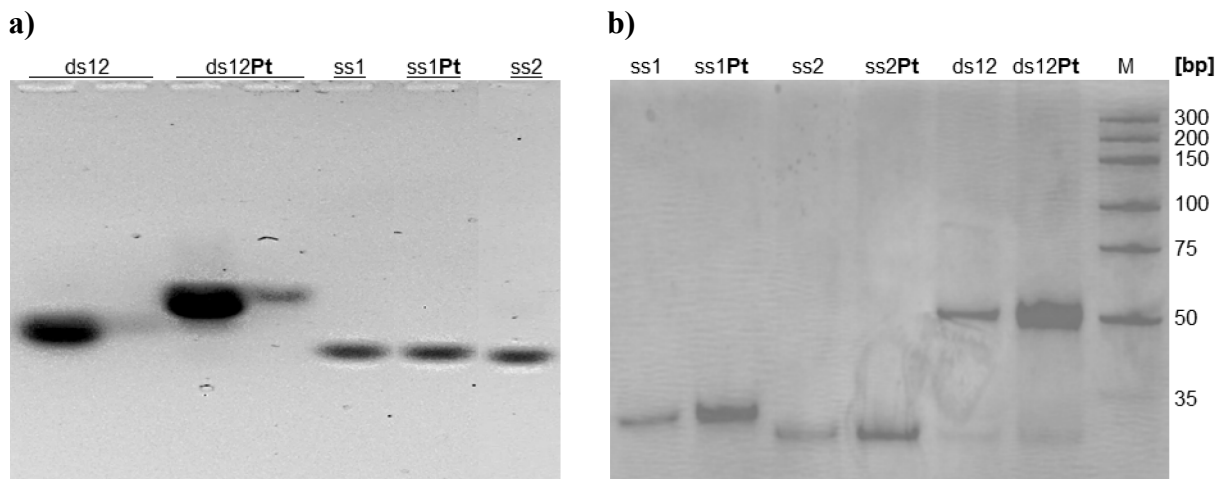


Abbildung 7.9: Gele der nicht-platinieren und platinieren DNA-Oligomere. **a)** 5 %-iges Agarose-Gel (TAE-Puffer). **b)** 17,5 %-iges natives TBE-Gel. Als Marker wurde ein DNA-Standard aus ds-DNA-Oligomeren eingesetzt (Länge in Basenpaaren [bp]).

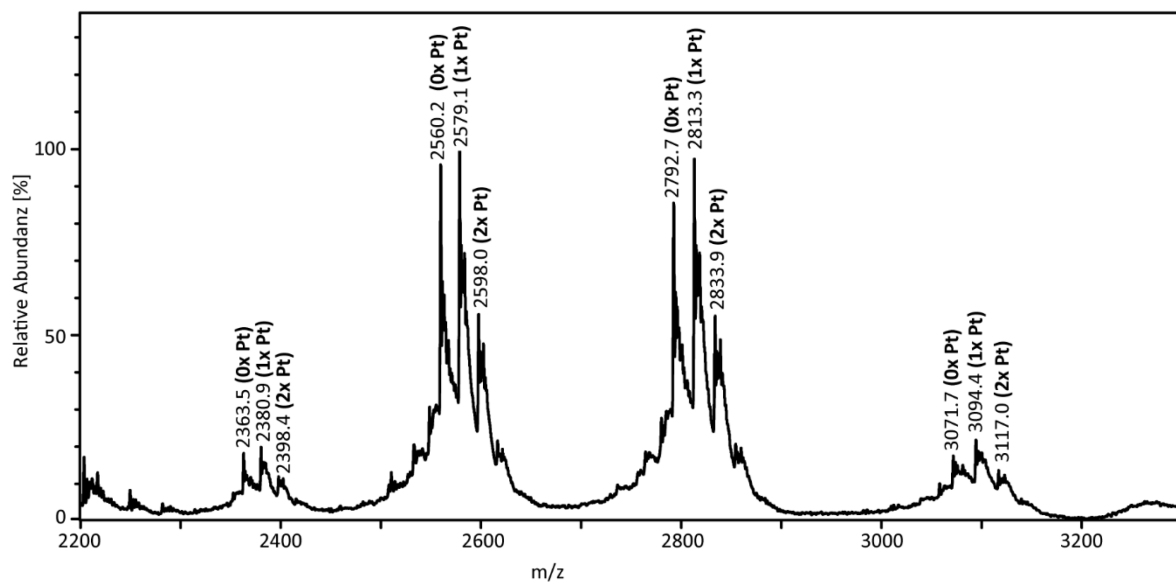


Abbildung 7.10: Nano-ESI Q-ToF Massenspektren des platinieren Doppelstrangs ds12 ($c = 10 \mu\text{M}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$, DNA/Cisplatin 1:2) bei negativer Ionisation und einer KE von 60 eV.

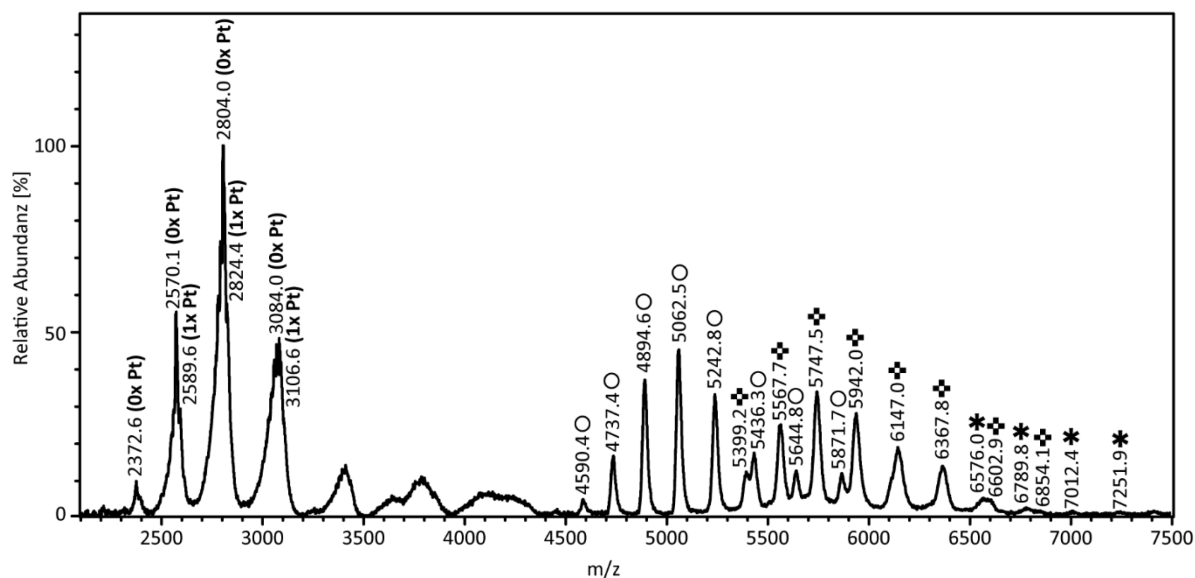


Abbildung 7.11: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des AK-AG-Komplexes ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$) mit dem platinieren ds12 (DNA/Cisplatin 1:1) bei einer KE von 50 eV. (O = Signale des freien cPAK, ⬧ = Signale des 1:1 AK-AG-Komplexes, * = Signale des 1:2 AK-AG-Komplexes).

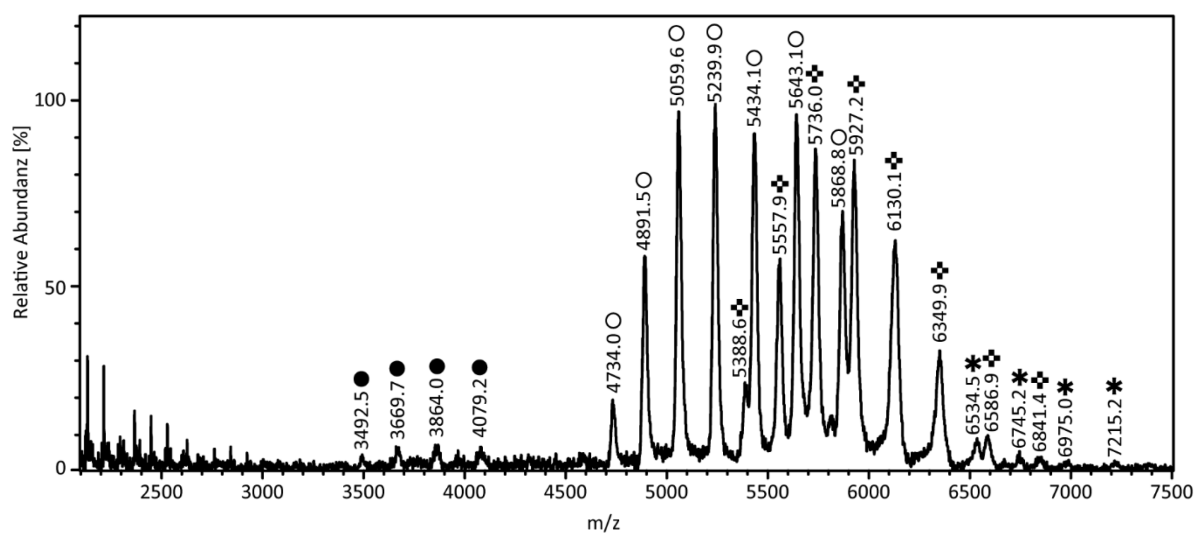


Abbildung 7.12: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum des AK-AG-Komplexes ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$) mit dem platinieren ds12 (DNA/Cisplatin 1:1) bei einer KE von 80 eV. (O = Signale des freien cPAK, ⬧ = Signale des 1:1 AK-AG-Komplexes, * = Signale des 1:2 AK-AG-Komplexes).

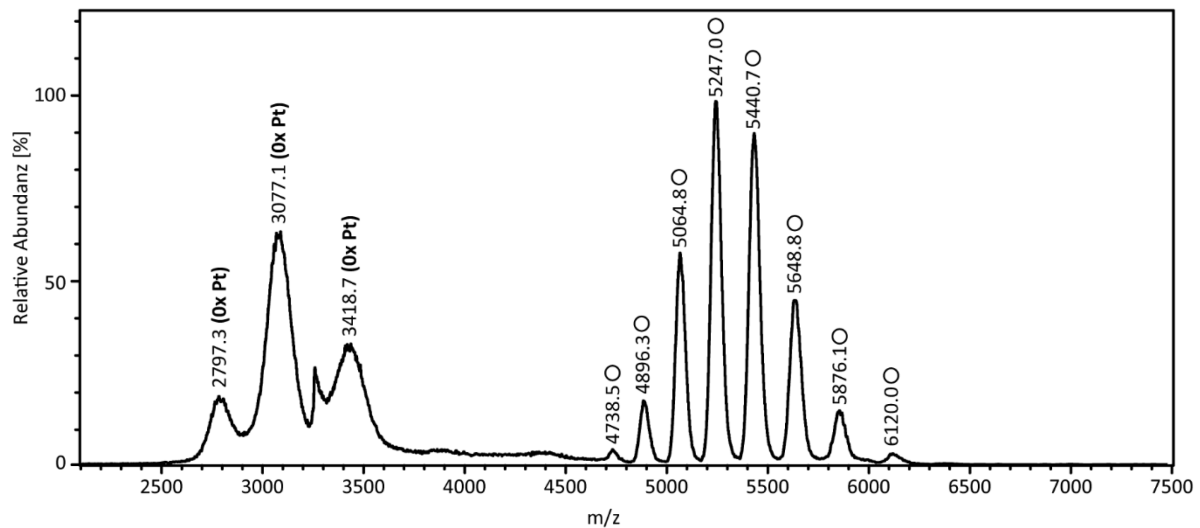


Abbildung 7.12: Nano-ESI Q-ToF-Massenspektrum der Negativkontrolle des AK-AG-Komplexes ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$). Dazu wurde der cPAK mit unplatiniertem Doppelstrang ds12 im äquimolaren Verhältnis inkubiert und bei einer KE von 50 eV analysiert. (O = Signale des freien cPAK)

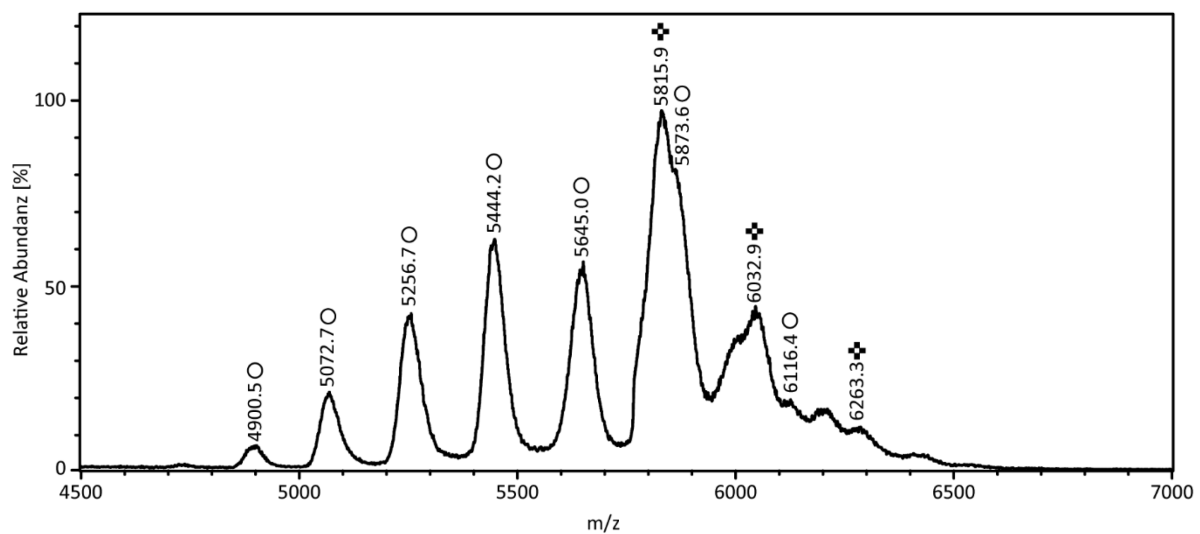


Abbildung 7.12: Nano-ESI Q-ToF Massenspektrum des AK-AG-Komplexes ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in $200 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$) mit dem platinierten Einzelstrang ss2 (DNA/Cisplatin 1:1) bei einer KE von 50 eV . (O = Signale des freien cPAK, ✦ = Signale des 1:1 AK-AG-Komplexes)

7.2 Ergänzendes zur Antikörper-Sequenzierung

Sequenzierungsreport von ALDEVRON



CUSTOMER :

Dr Ulrike Hochkirch
Humboldt Universität zu Berlin
Institut für Chemie
Brook-Taylor-Str. 2
Berlin 12489
Germany

YOUR CONTACT AT ALDEVRON FREIBURG :

Dr Stefan Lang
slang@aldevron.com
+49 (0)761 45636 16

DATE: 25/04/2012

Sequence analysis of monoclonal antibody genes

PROJECT OBJECTIVE:

The aim of this project is to identify and sequence the full length immunoglobulin genes expressed by rat hybridoma sample R-C18 (mAb 18D10).

DELIVERABLES:

Aldevron delivers a project report, annotated sequences of the identified genes, and the corresponding sequencing trace files. CDRs are highlighted in the amino acid sequence.

METHOD:

Immunoglobulin genes expressed by the rat hybridoma R-C18 (mAb 18D10) were amplified with sets of proprietary primers from cDNA generated directly from the flash frozen hybridoma cells provided by the Client using our proprietary RT-PCR protocol and sequenced using a standard dye-terminator capillary sequencing method.

RESULTS:



Annotated sequences of the identified heavy chain genes:

LOCUS	18D10_HC	1389 bp	DNA	linear	22-APR-2013
DEFINITION	Heavy chain				
FEATURES	Location/Qualifiers				
C_region	415..1386 /label=C\region				
J_segment	382..414 /label=JH				
V_segment	349..381 /label=CDR3				
V_region	253..348 /label=FWR3				
V_segment	205..252 /label=CDR2				
V_region	163..204 /label=FWR2				
V_segment	148..162 /label=CDR1				
V_region	58..147 /label=FWR1				
sig_peptide	1..57 /label=LS				
CDS	1..1386 /label=18D10_HC /translation="MAVLVMLLCLVTFPSCVLSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTLCTVSGFSLN NYGLS WVRQPPGKGLEWIA AISSGGRTFYNSILKS RLSISRDTSQSQVFLKMNSLQTEDTAIYFCSD DTGKYGGPWY WGQGVMTVSSAETTPSPVYF LAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAPVLSDLTYLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAPPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHGLHNHHTKSLSHSPGK."				
BASE COUNT	348 a	396 c	339 g	306 t	
ORIGIN	1 atggctgtcc tggatgatgt gctctgcctg gtgacattcc caagctgtgt cctgtcccag 61 gtgcaactga aagagtcagg acctggctctg gtgcagccct cacagaccct gtctctcacc 121 tgcactgtct ctggattctc attaaac aac tatgggttaa gttgggttcg ccagcctcca 181 gggaagggtc tggagtggat tgcagcaata tcaagtgggtg gacgcacatt ttataattca 241 attctcaaat cc cgactgag catcagtagg gacacttccc agagccaagt tttcttaaaa 301 atgaacagtc tgcaaaactga agacacagcc atttacttct gttccagaga cggaaccggg 361 aagtatggag gcccctggta ct ggggccaa ggagtcattg tcacagtctc ctcagctgaa 421 acaacagccc catctgtcta tccactggcc cctggatctg ctgcccacac taactccatg 481 gtgaccctgg gatgcctggg caagggctat ttccctgagc cagtgcacgt gacctggaac 541 tctggatccc tgtccagcgg tgtgcacacc ttcccagctg tectgcagtc tgacctctac 601 actctgagca gctcagtgac tgtcccctcc agcacctggc ccagcgagac cgtcacctgc 661 aacgttgccc acccggccag cagcaccaag gtggacaaga aaattgtgcc cagggattgt 721 ggttgtaagc cttgcatatg tacagtccca gaagtatcat ctgtcttcat cttcccccca 781 aagcccaagg atgtgctcac cattactctg actcctaagg tcacgtgtgt tgtggtagac 841 atcagcaagg atgatcccg ggtccagttc agctggtttg tagatgatgt ggaggtgcac 901 acagctcaga cgcaaccccg ggaggagcag ttcaacagca ctttccgctc agtcagtgaa 961 cttcccatca tgcaccagga ctggctcaat ggcaaggagt tcaaatgcag ggtcaacagt 1021 gcagctttcc ctgcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaaggcag accgaaggct				



```

1081 ccacaggtgt acaccattcc acctcccaag gagcagatgg ccaaggataa agtcagtctg
1141 acctgcatga taacagactt ctccctgaa gacattactg tggagtggca gtggaatggg
1201 cagccagcgg agaactacaa gaacactcag cccatcatgg acacagatgg ctcttacttc
1261 gtctacagca agctcaatgt gcagaagagc aactgggagg caggaaatac tttcacctgc
1321 tctgtgttac atgagggcct gcacaaccac catactgaga agagcctctc ccactctccg
1381 ggtaaatga

```

Annotated sequences of the identified light chain genes:

```

LOCUS      18D10_KC          705 bp      DNA      linear      22-APR-2013
DEFINITION  Kappa chain
FEATURES             Location/Qualifiers
     C_region         382..702
                        /label=C\region
     J_segment        352..381
                        /label=JK
     V_segment        325..351
                        /label=CDR3
     V_region         229..324
                        /label=FWR
     V_segment        208..228
                        /label=CDR2
     V_region         163..207
                        /label=FWR2
     V_segment        130..162
                        /label=CDR1
     V_region         61..129
                        /label=FWR1
     sig_peptide       1..60
                        /label=LS
     CDS              1..705
                        /label=18D10_KC
                        /translation="MMAAVQLLGLLLWVPALRCDIQMTQSPSLLSASVGDRV
FNC KAGQSIYKSLN WYHQKLGEAPKLLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSLPEDFGTYFC FQHHSWPDTFGAGTKLELKRADAAPTVISIFPPSTEQLATG
GASVVC LMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVLDVTDQDSKDYMSSTLSLT
KADYESHNLTYTCEVVHKTS SSPVVKSFNRNEC."
BASE COUNT      191 a          177 c          164 g          173 t
ORIGIN
      1 atgatggctg cagttcagct cttagggctg ctgctgcttt gggteccagc cctgagatgt
     61 gacatccaga tgaccagtc tccttcactc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact
    121 ttcaactgc a aagcaggtca gattatttac aagtccttaa actgggtatca tcaaaagctt
    181 ggagaagctc ccaaactcct gatataaat acaaataatt tacaaacggg cgtcccatca
    241 aggttcagtg gcagtggatc tggtagagat tacacactca ccatcagcag cctgcagcct
    301 gaagattttg gcacatattt ctgcttttcag catcatagtt ggcctgacac gtttgagact
    361 gggaccaagc tggaaactgaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatctat cttccacca
    421 tccacggaac agttagcaac tggaggtgcc tcagtcgtgt gctcatgaa caacttctat
    481 ccagagaca tcagtgcaa gtggaagatt gatggcactg aacgacgaga tgggtgcctg
    541 gacagtgtta ctgacagga cagcaaagac agcacgtaca gcatgagcag caccctctcg
    601 ttgaccaagg ctgactatga aagtcataac ctctatacct gtgaggttgt tcataagaca
    661 tcatcctcac ccgtcgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gtttag

```

PEAKS-Resultate der Datenbank-Suche

Die Peptide, die in einem der proteolysierten Proben mittels MS und MS/MS-Spektrum durch Datenbank-Abgleich gefunden wurden, sind als blaue Balken dargestellt. Peptide, die durch De Novo-Sequenzierung gefunden wurden und mindestens in fünf Aminosäuren der Datenbank-Sequenz gleichen, sind grau unterlegt. Die PTMs sind unterschiedlich farblich markiert, eine Legende befindet sich unten rechts. PTMs an Aminosäuren, die im MS/MS-Spektrum eine relative Intensität von mindestens 5 % aufweisen, sind oberhalb der Sequenz als Index aufgeführt. Die anderen PTMs sind nur auf dem jeweils detektierten Peptid an der Position der entsprechenden Aminosäure markiert.

Sequenzabdeckung der HC des Ratten-IgG2a Q5M842 aus der UniProt DB

QVQLMESGPG LVQPSETLSL I**CTVSGF**SLT SYN**VH****WVRQP** **PGKGLEW**MGV MWSGGNTDYN

SALK**SRLSIS** **RDTS**KNQVFL KMNSLQSEDA TTYYCAREGY PYYFNY**WGQG** **VMVT**VSSAET

TAPSVYPLAP **GTALK**SNSMV **TLGCL**VKGYF **PEPVT**VTWNS **GALSS**GVHTF **PAVLQ**SGLYT

LTSSVTVPS **TWSSQ**AVTCN **VAHPAS**STKV **DKKIV**PRECN **PCGCT**GSEVS **SVFIF**PPKTK

DVLTITLTPK **VTCV**VDISQ **NDPEV**RFSWF **IDDVE**VHTAQ **THAPE**KQSNS **TLRSV**SELPI

VHRDWLNGKT **FKCKV**NSGAF **PAPIE**KSISK **PEGTP**RGPQV **YTMAPP**KEEM **TQSQV**SITCM

VKGFYPPDIY **TEWK**MNGQPQ **ENYKN**TPPTM **DTDGS**YFLYS **KLVN**VKETWQ **QGN**TFTCSVL

HEGLHNHTE **KSLSH**SPGK

CT	LysN
GluC	TL
LysC	Tr

7. ANHANG

Identifizierte Peptide der LC (ALDEVRON-Sequenz) für Trypsin



- Amidation (-0.98)
- Carbamidomethylation (+57.02)
- Carbamidomethylation (DHKE, X@N-term) (+57.02)
- Deamidation (NQ) (+0.98)
- Dethiomethyl (-48.00)
- Formylation (+27.99)
- Iodination (+125.90)
- Oxidation (M) (+15.99)

7. ANHANG

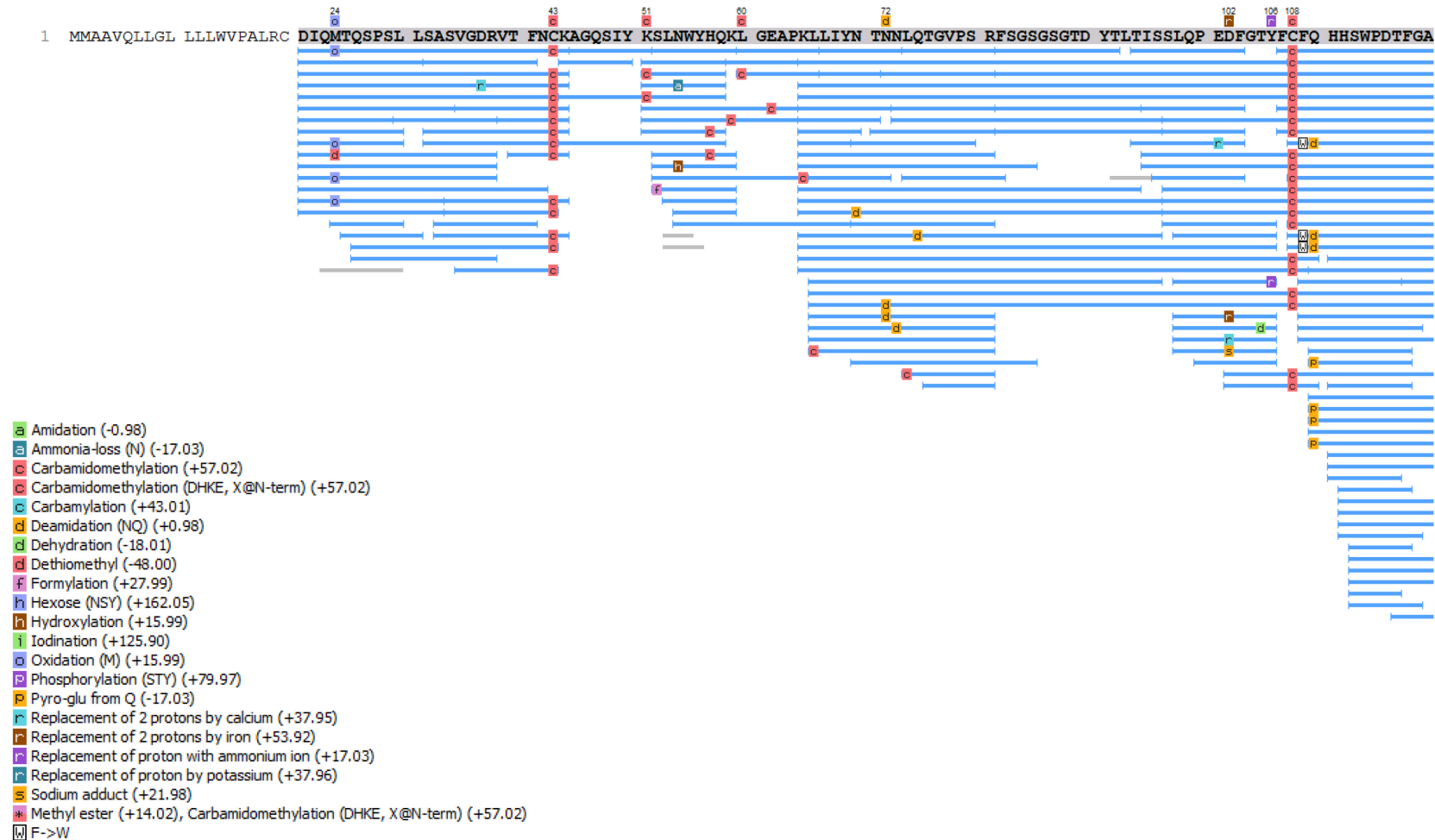
Identifizierte Peptide der HC (ALDEVRON-Sequenz) für Trypsin



- a Amidation (-0.98)
- c Carbamidomethylation (+57.02)
- c Carbamidomethylation (DHKE, X@N-term) (+57.02)
- c Carbamylation (+43.01)
- d Deamidation (NQ) (+0.98)
- d Dehydration (-18.01)
- d Dethiomethyl (-48.00)
- f Formylation (+27.99)
- h Hexose (NSY) (+162.05)
- i Iodination (+125.90)
- o Oxidation (M) (+15.99)
- p Pyro-glu from Q (-17.03)
- r Replacement of 2 protons by calcium (+37.95)
- r Replacement of proton by potassium (+37.96)

7. ANHANG

Identifizierte Peptide der LC (ALDEVRON-Sequenz) für alle sechs Enzyme



7. ANHANG

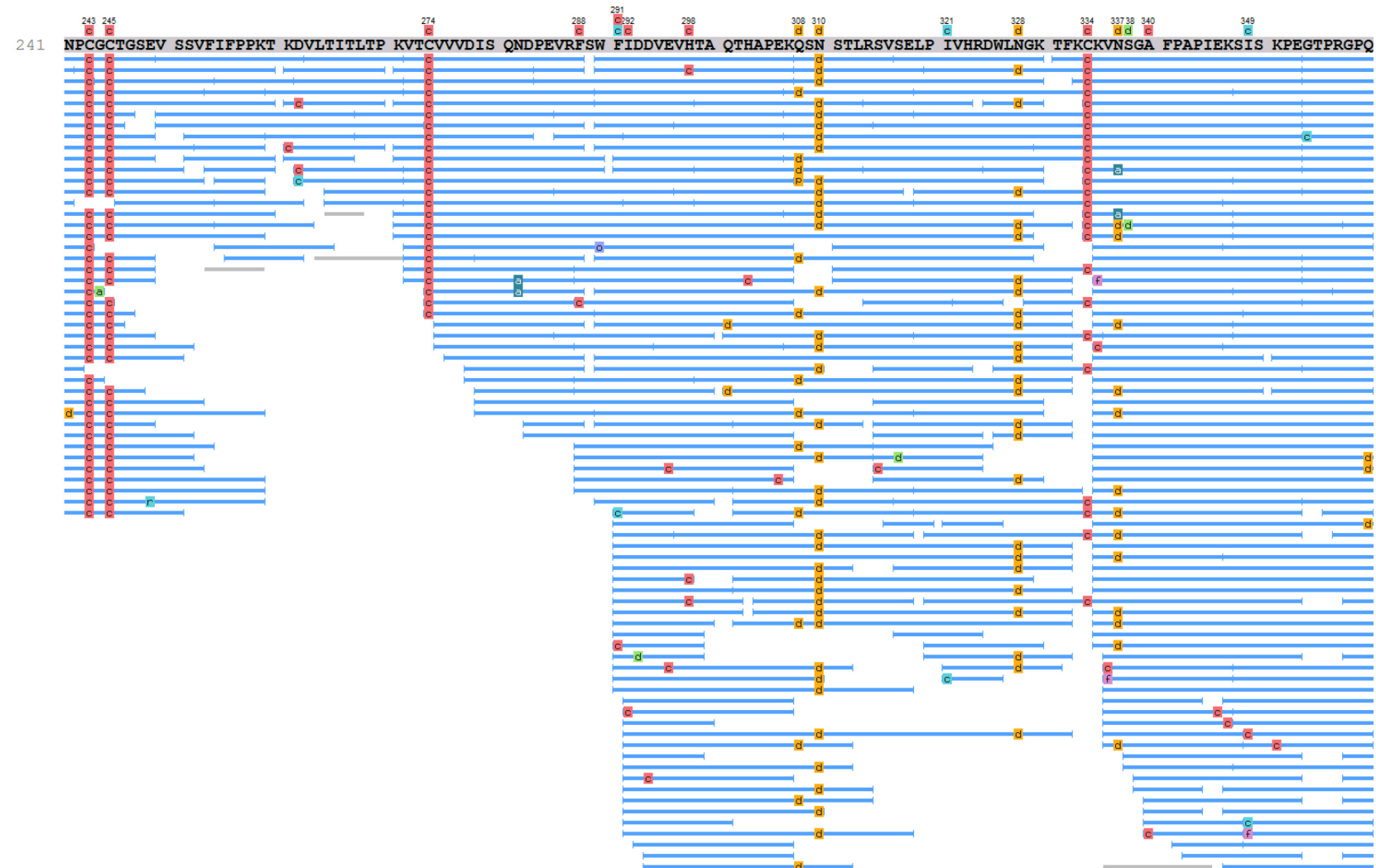


7. ANHANG

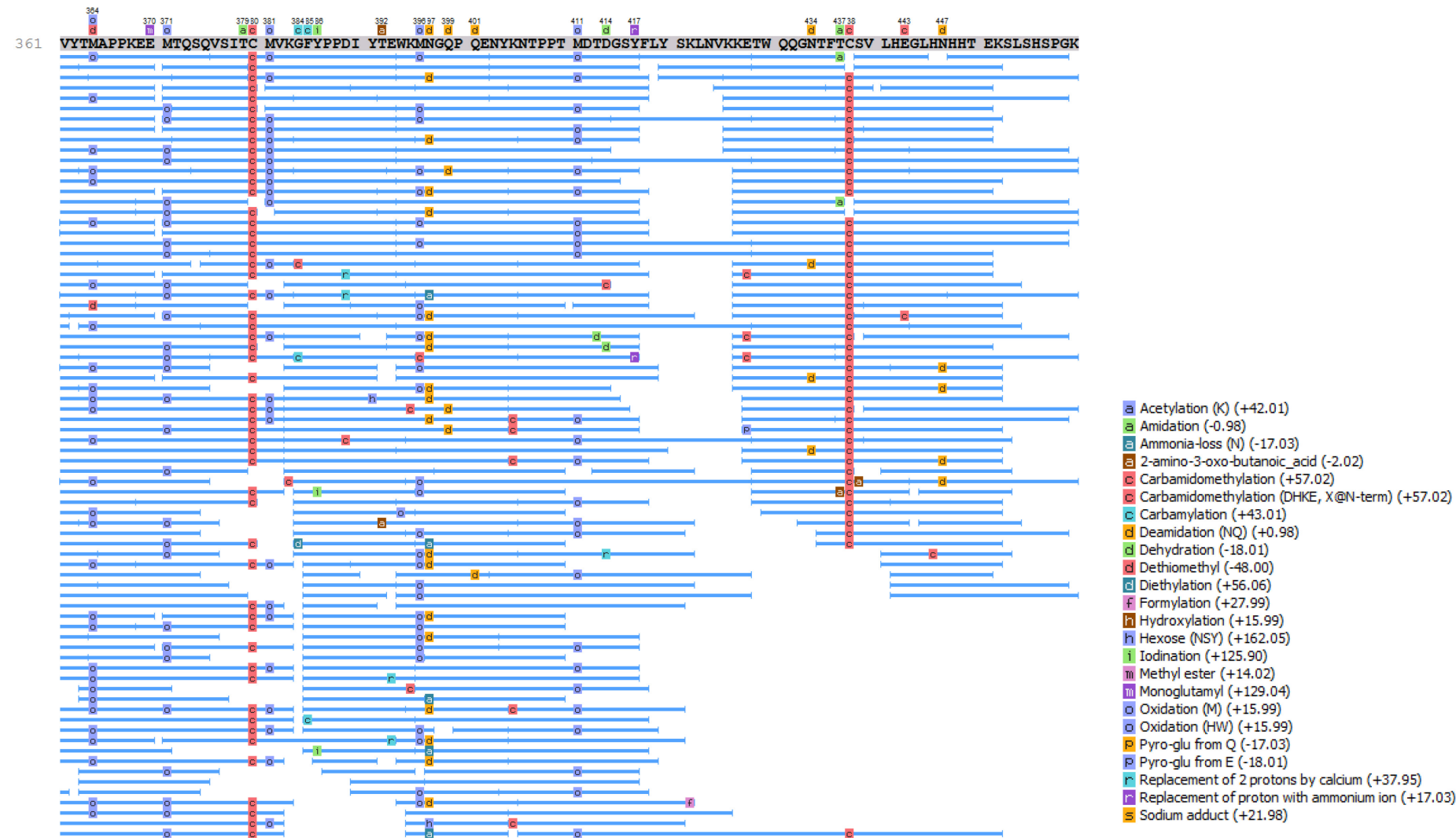
Identifizierte Peptide der HC (Hybridsequenz) für alle Enzyme



7. ANHANG



7. ANHANG



7. ANHANG

Manuelle Suche nach Glycopeptiden mittels Xcalibur

Chymotrypsin		MW [Da]	[M+2H] ²⁺			[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺		
			2	gefund.	[ppm]	3	gefund.	[ppm]	4	gefund.	[ppm]	5	gefund.	[ppm]
0	IDDVEVHTAQTHAPEKQ SNSTL	2420.1455	1211.0806	-		807.7230	-		606.0442	-		485.0369	-	
1	IDDVEVHTAQTHAPEKQ SNST LRSVSELPVHRDW	3994.9772	1998.4964	-		1332.6669	-		999.7521	-		800.0033	-	
1	FIDDVEVHTAQTHAPEKQ SNSTL	2567.2139	1284.6148	-		856.7458	-		642.8113	-		514.4506	-	
2	IDDVEVHTAQTHAPEKQ SNST LRSVSELPVHRDWL	4108.0613	2055.0385	-		1370.3616	-		1028.0231	-		822.6201	-	
2	FIDDVEVHTAQTHAPEKQ SNST LRSVSELPVHRDW	4142.0456	2072.0306	-		1381.6897	-		1036.5192	-		829.4170	-	
2	SWFIDDVEVHTAQTHAPEKQ SNSTL	2840.3253	1421.1705	-		947.7829	-		711.0891	-		569.0729	-	

GluC *		MW [Da]	[M+2H] ²⁺			[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺		
			2	gefund.	[ppm]	3	gefund.	[ppm]	4	gefund.	[ppm]	5	gefund.	[ppm]
0	KQ S N S T L R S V S E	1335.6630	668.8393	668.8384	-1.4	446.2288	446.228	-1.8	334.9236	-		268.1404	-	
1	KQ S N S T L R S V S E L P I V H R D	2166.1392	1084.0774	-		723.0542	-		542.5426	-		434.2357	-	
1	V H T A Q T H A P E KQ S N S T L R S V S E	2407.1727	1204.5942	-		803.3987	803.397	-1.7	602.8010	602.8001	-1.5	482.4424	482.4414	-2.0
2	V H T A Q T H A P E KQ S N S T L R S V S E L P I V H R D	3237.6490	1619.8323	-		1080.2242	-		810.4201	-		648.5376	-	
2	V E V H T A Q T H A P E KQ S N S T L R S V S E	2635.2837	1318.6497	-		879.4357	879.435	-1.2	659.8288	659.8279	-1.3	528.0646	528.0638	-1.5

LysC *		MW [Da]	[M+2H] ²⁺			[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺		
			2	gefund.	[ppm]	3	gefund.	[ppm]	4	gefund.	[ppm]	5	gefund.	[ppm]
0	Q SNST LRSVSELPVHRDWLNGK	2636.3670	1319.1913	1319.187	-3.1	879.7968	879.795	-2.3	660.0996	660.0982	-2.1	528.2812	528.2801	-2.1
1	Q SNST LRSVSELPVHRDWLNGKTFK	3012.5780	1507.2968	-		1005.2005	-		754.1523	-		603.5234	-	
2	Q SNST LRSVSELPVHRDWLNGKTFKCK	3243.6822	1622.8489	-		1082.2352	-		811.9284	-		649.7443	-	

7. ANHANG

		[M+2H] ²⁺			[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺		
LysN *	MW [Da]	2	gefund.	[ppm]	3	gefund.	[ppm]	4	gefund.	[ppm]	5	gefund.	[ppm]
0 KQSNSTLRSVSELPVHRDWLNG	2636.3670	1319.1913	-		879.7968	-		660.0996	660.0975	-3.1	528.2812	528.2793	-3.6
1 KQSNSTLRSVSELPVHRDWLNGKTF	3012.5780	1507.2968	-		1005.2005	-		754.1523	-		603.5234	603.5214	-3.4
2 KQSNSTLRSVSELPVHRDWLNGKTFKC	3243.6822	1622.8489	-		1082.2352	-		811.9284	811.9243	-5.0	649.7443	649.7412	-4.7

		[M+2H] ²⁺			[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺		
Thermolysin	MW [Da]	2	gefund.	[ppm]	3	gefund.	[ppm]	4	gefund.	[ppm]	5	gefund.	[ppm]
0 AQTHAPEKQSNST	1398.6375	700.3266	-		467.2203	-		350.6672	-		280.7353	-	
1 AQTHAPEKQSNSTLRS	1754.8547	878.4352	-		585.9594	-		439.7215	-		351.9788	-	
1 IDDEVHTAQTHAPEKQSNST	2307.0615	1154.5386	-		770.0283	770.026	-3.4	577.7732	577.7713	-3.3	462.4201	-	
2 AQTHAPEKQSNSTLRVSELP	2280.1346	1141.0751	-		761.0527	761.055	2.7	571.0415	571.0431	2.9	457.0347	-	
2 IDDEVHTAQTHAPEKQSNSTLRS	2663.2786	1332.6471	-		888.7674	-		666.8275	-		533.6636	-	
2 FIDDEVHTAQTHAPEKQSNST	2454.1299	1228.0728	-		819.0511	819.049	-3.2	614.5403	614.5381	-3.6	491.8338	-	

		[M+2H] ²⁺			[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺		
	MW [Da]	2	gefund.	[ppm]	3	gefund.	[ppm]	4	gefund.	[ppm]	5	gefund.	[ppm]
0 QSNSTLR	805.3930	403.7043	-		269.4722	-		202.3561	-		162.0864	-	
1 QSNSTLRVSELPVHR	1923.0173	962.5165	-		642.0136	-		481.7622	-		385.6113	-	
1 FSWFIDDEVHTAQTHAPEKQSNSTLR	3143.4948	1572.7552	-		1048.8394	-		786.8815	-		629.7068	629.7046	-3.5
2 QSNSTLRVSELPVHRDWLNGK	2636.3670	1319.1913	-		879.7968	-		660.0996	-		528.2812	-	
2 FSWFIDDEVHTAQTHAPEKQSNSTLRVSELPVHR	4261.1191	2131.5674	-		1421.3809	-		1066.2876	-		853.2317	-	

* Für GluC, LysC, LysN und Trypsin wurden nicht alle theoretischen Peptide berücksichtigt, sondern nur die, deren Detektion mit der gewählten HPLC-MS-Methode wahrscheinlich bzw. überhaupt möglich ist.

7. ANHANG

1	GluC	Zucker	MW [Da]	[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺		
				3	gefund.	[ppm]	4	gefund.	[ppm]	5	gefund.	[ppm]
1	VHTAQTHAPEKQ SNST LRVSE	G0-gn	3501.5853	1168.2029	-		876.4042	876.4036	-0.6	701.3249	701.3245	-0.6
		G1-gn	3663.6381	1222.2205	-		916.9174	916.9175	0.2	733.7354	733.7349	-0.7
		G0	3704.6646	1235.8960	1235.8964	0.3	927.1740	927.1738	-0.2	741.9408	741.9404	-0.5
		G1	3866.7175	1289.9137	1289.9109	-2.1	967.6872	967.6871	-0.1	774.3513	774.3510	-0.4
		G2	4028.7703	1343.9313	-		1008.2004	1008.1998	-0.6	806.7619	806.7609	-1.2
		G0gn	3907.7440	1303.5892	-		977.9438	977.9433	-0.5	782.5566	782.5561	-0.7
		G1gn	4069.7968	1357.6068	-		1018.4570	1018.4454	-11.4	814.9672	814.9663	-1.1
		G2gn	4231.8497	1411.6244	-		1058.9703	-		847.3778	-	
		G0F-gn	3647.6432	1216.8889	-		912.9186	912.9165	-2.3	730.5365	730.5355	-1.3
		G1F-gn	3809.6960	1270.9065	-		953.4318	953.4306	-1.3	762.9470	762.9473	0.4
		G0F	3850.7225	1284.5820	1284.5821	0.1	963.6885	963.6882	-0.3	771.1523	771.1520	-0.4
		G1F	4012.7754	1338.5996	1338.5984	-0.9	1004.2017	1004.2014	-0.3	803.5629	803.5625	-0.5
		G2F	4174.8282	1392.6172	-		1044.7149	1044.7142	-0.7	835.9735	835.9727	-0.9
		G0Fgn	4053.8019	1352.2751	-		1014.4583	1014.4582	-0.1	811.7682	811.7677	-0.6
		G1Fgn	4215.8548	1406.2928	-		1054.9715	1054.9707	-0.8	844.1788	844.1782	-0.7
		G2Fgn	4377.9076	1460.3104	-		1095.4847			876.5894		
		G1F Sia1	4321.8657	1441.6297	-		1081.4743	1081.4763	1.9	865.3810	865.3819	1.1
2	VEVHTAQTHAPEKQ SNST LRVSE	G0-gn	3729.6963	1244.2399	-		933.4319	-		746.9471	-	
		G1-gn	3891.7491	1298.2575	-		973.9451	-		779.3576	779.3543	-4.3
		G0	3932.7756	1311.9330	-		984.2017	984.1999	-1.9	787.5630	787.5616	-1.7
		G1	4094.8285	1365.9507	-		1024.7150	1024.7079	-6.9	819.9735	819.9726	-1.1
		G2	4256.8813	1419.9683	-		1065.2282	1065.2288	0.6	852.3841	852.3823	-2.1
		G0gn	4135.8550	1379.6262	-		1034.9716	1034.9688	-2.7	828.1788	828.1775	-1.6
		G1gn	4297.9078	1433.6438	-		1075.4848	-		860.5894	-	
		G2gn	4459.9607	1487.6614	-		1115.9980	-		893.0000	-	

7. ANHANG

G0F-gn	3875.7542	1292.9259	-		969.9464	969.9464	0.0	776.1587	776.1568	-2.4
G1F-gn	4037.8070	1346.9435	-		1010.4596	-		808.5692	808.5670	-2.8
G0F	4078.8335	1360.6190	-		1020.7162	1020.7136	-2.6	816.7745	816.7735	-1.3
G1F	4240.8864	1414.6366	-		1061.2294	1061.2263	-3.0	849.1851	849.1839	-1.4
G2F	4402.9392	1468.6542	-		1101.7426	-		881.5957	881.5948	-1.0
G0Fgn	4281.9129	1428.3121	-		1071.4861	1071.4836	-2.3	857.3904	857.3891	-1.5
G1Fgn	4443.9658	1482.3298	-		1111.9993	1111.9988	-0.4	889.8010	889.7999	-1.2
G2Fgn	4606.0186	1536.3474	-		1152.5125	-		922.2116	-	
G1F_Sial	4547.9767	1517.0001	-		1138.0020	-		910.6032	-	

LysC		Zucker	MW [Da]	[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺		
				3	gefund.	[ppm]	4	gefund.	[ppm]	5	gefund.	[ppm]
0	QSNSTLRVSELPVHRDWLNGK	G0-gn	3730.7796	1244.6010	-		933.7027	933.6986	-4.4	747.1637	747.1625	-1.7
		G1-gn	3892.8324	1298.6186	-		974.2159	974.2135	-2.5	779.5743	779.5723	-2.6
		G0	3933.8589	1312.2941	1312.2901	-3.1	984.4726	984.4704	-2.2	787.7796	787.7783	-1.7
		G1	4095.9118	1366.3118	-		1024.9858	1024.9822	-3.5	820.1902	820.1883	-2.3
		G2	4257.9646	1420.3294	-		1065.4990	1065.4961	-2.7	852.6007	852.5987	-2.4
		G0gn	4136.9383	1379.9873	-		1035.2424	1035.2396	-2.7	828.3955	828.3935	-2.4
		G1gn	4298.9911	1434.0049	-		1075.7556	-		860.8060	860.8038	-2.6
		G2gn	4461.0440	1488.0225	-		1116.2688	-		893.2166	-	
		G0F-gn	3876.8375	1293.2870	-		970.2172	970.2100	-7.4	776.3753	776.3729	-3.1
		G1F-gn	4038.8903	1347.3046	-		1010.7304	1010.7223	-8.0	808.7859	808.7834	-3.1
		G0F	4079.9168	1360.9801	1360.9739	-4.6	1020.9870	1020.9850	-2.0	816.9912	816.9898	-1.7
		G1F	4241.9697	1414.9977	1414.9906	-5.0	1061.5003	1061.4974	-2.7	849.4018	849.4002	-1.8
		G2F	4404.0225	1469.0153	-		1102.0135	1102.0082	-4.8	881.8123	881.8101	-2.5
		G0Fgn	4282.9962	1428.6732	-		1071.7569	1071.7545	-2.2	857.6071	857.6055	-1.8
		G1FgnF	4445.0491	1482.6909	-		1112.2701	1112.2661	-3.6	890.0176	890.0159	-2.0
		G2Fgn	4607.1019	1536.7085	-		1152.7833	-		922.4282	-	-0.4
		G1F_Sial	4549.0600	1517.3612	-		1138.2728	-		910.8198	910.8169	-3.2

7. ANHANG

			[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺				
LysN			Zucker	MW [Da]	3	gefund.	[ppm]	4	gefund.	[ppm]	5	gefund.	[ppm]
0	KQSN ST LRSVSELPIVHRDWLNG	G0	3933.8590	1312.2942				984.4726			787.7796	787.7782	-1.8
	29.9 min (→ 31.3 min)	G0F	4079.9169	1360.9801	-			1020.9871	1020.9857	-1.3	816.9912	816.9959	5.7

Thermolysin		Zucker	MW [Da]	[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺		
				3	gefund.	[ppm]	4	gefund.	[ppm]	5	gefund.	[ppm]
1	IDDVEVHTAQTHAPEKQSN ST	G0-gn	3401.4740	1134.8325	-		851.3763	851.3790	3.1	681.3026	-	
	14.9 min (→ 15.9 min)	G1-gn	3563.5268	1188.8501	-		891.8895	891.8861	-3.9	713.7132	-	
		G0	3604.5534	1202.5256	1202.5209	-3.9	902.1462	902.1429	-3.6	721.9185	-	
		G1	3766.6063	1256.5432	-		942.6594	942.6565	-3.1	754.3291	-	
		G2	3928.6591	1310.5608	-		983.1726	983.1682	-4.5	786.7396	-	
		G0gn	3807.6328	1270.2187	-		952.9160	952.9100	-6.3	762.5344	-	
		G1gn	3969.6856	1324.2363	-		993.4292	993.4250	-4.2	794.9449	-	
		G2gn	4131.7385	1378.2540	-		1033.9424	-		827.3555	-	
		G0F-gn	3547.5319	1183.5185	-		887.8908	887.8981	8.2	710.5142	-	
		G1F-gn	3709.5847	1237.5361	-		928.4040	928.3996	-4.8	742.9248	-	
		G0F	3750.6113	1251.2116	-		938.6606	938.6570	-3.9	751.1301	-	
		G1F	3912.6642	1305.2292	-		979.1739	979.1695	-4.5	783.5407	-	
		G2F	4074.7170	1359.2468	-		1019.6871	1019.6831	-3.9	815.9512	-	
		G0Fgn	3953.6907	1318.9047	-		989.4305	989.4273	-3.2	791.7460	-	
		G1Fgn	4115.7436	1372.9223	-		1029.9437	-		824.1565	-	
		G2Fgn	4277.7964	1426.9399	-		1070.4569	-		856.5671	-	
		G1F Sia1	4219.7545	1407.5926	-		1055.9464	-		844.9587	-	

7. ANHANG

2	FIDDEVHTAQTHAPEKQSNST	G0-gn	3548.5425	1183.8553	-		888.1434	888.1402	-3.6	710.7163	-	
	19.7 min (→ 20.5 min)	G1-gn	3710.5953	1237.8729	-		928.6566	928.6541	-2.7	743.1269	-	
		G0	3751.6218	1251.5484	1251.5449	-2.8	938.9133	938.9104	-3.1	751.3322	751.3292	-4.0
		G1	3913.6747	1305.5661	1305.5606	-4.2	979.4265	979.4236	-3.0	783.7428	783.7423	-0.6
		G2	4075.7275	1359.5837	-		1019.9397	1019.9358	-3.8	816.1533	-	
		G0gn	3954.7012	1319.2416	-		989.6831	989.6789	-4.3	791.9481	-	
		G1gn	4116.7540	1373.2592	-		1030.1963	1030.1900	-6.1	824.3586	-	
		G2gn	4278.8069	1427.2768	-		1070.7095			856.7692	-	
		G0F-gn	3694.6004	1232.5413	-		924.6579	924.6535	-4.8	739.9279	-	
		G1F-gn	3856.6532	1286.5589	-		965.1711	965.1675	-3.7	772.3385	-	
		G0F	3897.6797	1300.2344	1300.2334	-0.8	975.4277	975.4247	-3.1	780.5438	780.5418	-2.5
		G1F	4059.7326	1354.2520	1354.2446	-5.5	1015.9410	1015.9377	-3.2	812.9543	812.9511	-4.0
		G2F	4221.7854	1408.2696	-		1056.4542	1056.4555	1.3	845.3649	-	
		G0Fgn	4100.7591	1367.9275	1367.9317	3.1	1026.1976	1026.1946	-2.9	821.1596	821.1551	-5.5
		G1Fgn	4262.8120	1421.9452	-		1066.7108	1066.7069	-3.7	853.5702	-	
		G2Fgn	4424.8648	1475.9628	-		1107.2240			885.9808	-	
		G1F S1	4366.8229	1456.6155	-		1092.7135	-		874.3724	-	

7. ANHANG

		Zucker	MW [Da]	[M+3H] ³⁺			[M+4H] ⁴⁺			[M+5H] ⁵⁺		
				3	gefunden	[ppm]	4	gefunden	[ppm]	5	gefunden	[ppm]
1	FSWFIDDVEVHTAQTHAPEKQSNSTLR	G0-gn	4237.9074	1413.6436	-		1060.4847	-		848.5893	848.5888	-0.6
	31.7 min (→ 32.5 min)	G1-gn	4399.9602	1467.6612	-		1100.9979	-		880.9999	880.9943	-6.3
		G0	4440.9867	1481.3367	-		1111.2545	1111.2508	-3.33	889.2052	889.2027	-2.6
		G1	4603.0396	1535.3544	-		1151.7677	-		921.6157	921.6139	-2.0
		G2	4765.0924	1589.3720	-		1192.2809	-		954.0263	954.0229	-3.6
		G0gn	4644.0661	1549.0299	-		1162.0243	1162.0177	-5.72	929.8210	929.8165	-4.9
		G1gn	4806.1189	1603.0475	-		1202.5375	1202.5352	-1.95	962.2316	962.2272	-4.6
		G2gn	4968.1718	1657.0651	-		1243.0508	-		994.6422	-	
		G0F-gn	4383.9653	1462.3296	-		1096.9991	-		877.8009	877.7986	-2.6
		G1F-gn	4546.0181	1516.3472	-		1137.5123	-		910.2114	910.2077	-4.1
		G0F	4587.0446	1530.0227	-		1147.7690	1147.7652	-3.29	918.4167	918.4145	-2.4
		G1F	4749.0975	1584.0403	-		1188.2822	-		950.8273	950.8247	-2.8
		G2F	4911.1503	1638.0579	-		1228.7954	-		983.2379	983.2362	-1.7
		G0Fgn	4790.1240	1597.7158	-		1198.5388	1198.5338	-4.19	959.0326	959.0299	-2.8
		G1FgnF	4952.1769	1651.7335	-		1239.0520	1239.0457	-5.12	991.4432	991.4409	-2.3
		G2Fgn	5114.2297	1705.7511	-		1279.5652	-		1023.8538	-	
		G1F-S1	5056.1878	1686.4038	-		1265.0548			1012.2454	-	

